

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DES MICROARNS DANS LA DIFFÉRENCIATION MORPHOLOGIQUE
DES TROPHOBLASTES HUMAINS *IN VITRO*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MIRIANNE LEMIRE

OCTOBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier ma directrice de recherche Dre Julie Lafond et mon codirecteur le Dr Benoit Barbeau de m'avoir permis de réaliser ma maîtrise dans leurs laboratoires. Merci de votre générosité et de votre patience. Vous avez grandement contribué à affiner mon esprit critique et m'avez encouragée à faire preuve de rigueur. Je vous suis reconnaissante de m'avoir accordé une grande liberté tout au long de ma maîtrise, ce qui a permis de développer mon autonomie. Enfin, vous avez su par votre méthode de travail me démontrer un grand professionnalisme qui me servira d'exemple tout au long de ma vie professionnelle.

Merci à mes collègues du laboratoire de physiologie materno-fœtale. Je tiens à remercier particulièrement mes amies Isabelle Poudrier et Aline Conceição pour leur aide technique, leur disponibilité et pour m'avoir fait découvrir ce domaine de recherche. Enfin, un merci tout spécial au Dre Evemie Dubé pour sa rigueur scientifique et ses conseils toujours pertinents, mais surtout pour son amitié. Merci à mes collègues du laboratoire d'étude des rétrovirus humains. Je souhaite remercier plus spécialement Cynthia Torresilla pour son enthousiasme, sa curiosité et son amitié.

Merci à mes collègues du centre de recherche Biomed qui contribuent à faire de l'UQÀM cet endroit où il fait bon étudier et grâce à qui ces années se sont déroulées dans la bonne humeur et la camaraderie.

Merci à Daniel Lemieux, Luc Dubé, André Gervais, François Gendron, Denis Flipo, Hélène Beaumier, France Allard et Marie-Josée Carbonneau pour leur bonne humeur communicative, leur soutien matériel et technique, ainsi que leur conseils éclairés.

Je tiens à remercier tout spécialement Marilyne Labrie qui a su m'offrir à parts égales de précieux conseils et des remontrances comme seule une amie peut le faire.

Enfin, merci à ma famille et mes ami(e)s pour leur support et leurs encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	XI
RÉSUMÉ	XIX
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Formation du placenta.....	3
1.1.1 Stade pré-implantatoire et pré-lacunaire	3
1.1.2 Stade lacunaire et vilieux.....	4
1.2 La fusion chez les trophoblastes.....	6
1.2.1 Initiation du processus de fusion cellulaire	6
1.2.2 Aperçu général du processus de fusion cellulaire.....	7
1.2.3 Facteur de transcription GCM1	7
1.2.4 Protéines de jonctions cellulaires	8
1.2.5 Glycoprotéines membranaires d'origine rétrovirale.....	9
1.2.6 Externalisation des phosphatidylsérines.....	11
1.2.7 Remodelage du cytosquelette.....	12
1.3.1 Morphologie et fonctions du syncytiotrophoblaste	15
1.3.2 L'extrusion de matériel trophoblastique par le placenta	17
1.3.3 Transcription dans le syncytiotrophoblaste.....	18
1.4 Les microARNs	19
1.4.1 Organisation génomique et biosynthèse des miARNs	19
1.4.2 Fonctions et mécanismes d'action des miARNs	23
1.4.3 Régulation de l'expression des miARNs.....	25
1.5 MiARNs placenta-spécifiques	27
1.5.1 Fonctions des miARNs placentaires.....	28

1.6	Hypothèses de travail.....	33
CHAPITRE II		
	MÉTHODOLOGIE.....	35
2.1	Culture cellulaire	35
2.2	Interférence par ARN	35
2.3	Extraction des protéines cellulaires totales et immunobuvardage de type Western.....	36
2.4	Immunofluorescence	37
2.5	Dosage de la production de β -hCG	38
2.6	Extraction des ARNs totaux, transcription inverse (RT) et réaction en chaine par polymérase en temps réel (qPCR).....	38
2.7	Analyses bioinformatiques.....	40
2.8	Analyses statistiques.....	40
CHAPITRE III		
	RÉSULTATS.....	41
3.1	Mise au point de la transfection de siARNs ciblant le transcrit de Drosha	41
3.3	Les miARNs inhibent la différenciation morphologique des trophoblastes <i>in vitro</i>	45
3.4	L'augmentation de la fusion cellulaire mesurée pourrait être le résultat d'une augmentation de l'expression de Syncytine-2.	48
3.5	Des analyses <i>in silico</i> mettent en évidence deux familles de miARNs régulant l'expression de Syncytine-2.	50
CHAPITRE IV		
	DISCUSSION	57
CHAPITRE V		
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	71
5.1	Conclusions	71
5.2	Perspectives	72
APPENDICE A		
	CLASSIFICATION DES ARNS NON CODANTS	73
APPENDICE B		
	SYSTÈME D'ANNOTATION DES MICROARNS	75
APPENDICE C		
	RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES.....	79
	BIBLIOGRAPHIE	81

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schéma simplifié des principaux stades du développement placentaire humain.	5
1.2 Représentation des événements prenant place lors de la différenciation d'un CT en ST.	14
1.3 Illustrations des régions spécialisées de la surface villeuse.	16
1.4 Organisation génomique des gènes de miARNs.	20
1.5 Voie de biosynthèse canonique des miARNs.	22
1.6 Mécanismes d'action des miARNs.	24
3.1 Efficacité de transfection du réactif HiPerfect chez les cellules BeWo.	42
3.2 Mise au point de la transfection de siARNs ciblant le transcrit de la protéine nucléaire Drosha dans les cellules de la lignée BeWo.	43
3.3 Inhibition transitoire de l'expression de Drosha par de petits ARNs interférents.	44
3.4 Effet de la déplétion globale des miARNs sur la fusion cellulaire chez les cellules BeWo.	46
3.5 Effet de la déplétion globale des miARNs sur la différenciation des cellules BeWo <i>in vitro</i>	47
3.6 Effet de l'inhibition de Drosha sur l'expression du transcrit de protéines impliquées dans la fusion cellulaire chez les trophoblastes.	49
3.7 Deux groupes fonctionnels de miARNs ont été mis en évidence par des études de séquence.	53
3.8 Sites de liaison des miARNs candidats sur le transcrit de Syncytine-2.	55
4.1 Schéma récapitulatif présentant les pistes de recherche discutées lors de cette étude.	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 MiARNs dont l'expression est modulée par l'hypoxie.	30
1.2 MiARNs dont l'expression est plus élevée dans les placentas de grossesses compliquées par la prééclampsie.....	32
2.1 Amorces utilisées pour l'amplification des gènes à l'étude.	39
3.1 MiARNs ciblant des sites conservés sur le transcrit de Syncytine-2.....	51
3.2 MiARNs membres de la famille miR-515 ciblant des sites peu conservés sur le transcrit de Syncytine-2.....	52
4.1 Expression des miARNs candidats dans le placenta.	65
4.2 Caractérisation des miARNs de la famille miR-515 ciblant le transcrit de Syncytine-2.	66
A.1 Classification sommaire des ARNs non codants (ncARNs).	73
A.2 Classification sommaire des petits ARNs régulateurs.....	74
B.1 Illustration des suffixes employés dans la nomenclature de miARNs.	77
C.1 Effet de la déplétion globale des miARNs sur la progression du cycle cellulaire dans les cellules BeWo.....	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

3'-UTR	région non traduite en 3'
ADAM-12	<i>a disintegrin and metallopeptidase domain 12</i>
ADAR	<i>adenosine deaminase, RNA-specific</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ago2	argonaute 2
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1, PKBα</i>
AKT3	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3, PKBδ</i>
ALK7	<i>activin receptor like kinase 7</i>
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	analyse de la variance
ARN	acide ribonucléique
ARNi	interférence par ARN
ARNm	ARN messenger
ASCT1	<i>sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1, SLC1A4</i>
ASCT2	<i>sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2, SLC1A5</i>

ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATP	<i>adénosine triphosphate</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
C19MC	<i>cluster</i> ou grappe de miARNs du chromosome 19
CCN1	<i>CCN family member 1</i>
CCND1	<i>cycline D1</i>
CD98	<i>cluster of differentiation 98</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
CMH I	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CNN3	<i>calponine 3</i>
CO ₂	dioxyde de carbone, gaz carbonique
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>
CREB3L1	<i>cAMP responsive element binding protein 3-like 1, OASIS</i>
CRTC1	<i>CREB regulated transcription coactivator 1, TORC1</i>
CT	cytotrophoblaste
CYR61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DND1	<i>dead end homolog 1 (zebrafish)</i>
DTT	di-dithio-1,4 thréitol

DUSP1	<i>dual specificity phosphatase 1</i>
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EB	embryoblaste
EDTA-Na ₂	EDTA disodique
EFL1	<i>E74-like factor 1</i>
EFNB2	éphrine-B2
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
endo-siARN	petit ARN interférant endogène
Epac1	<i>exchange proteins activated by cyclic AMP, RAPGEF3</i>
ERK-1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ERVFRDE1	<i>endogenous retrovirus group FRD member 1, Syncytine-2</i>
ERVWE1	<i>endogenous retrovirus group W member 1, Syncytine-1</i>
ESC	cellules souches embryonnaires
ESCC	<i>embryonic stem cell-cell cycle</i>
EVT	trophoblaste extra-villeux
FBS	sérum de veau foetal
FMRP	<i>fragile X mental retardation 1</i>
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GCM1	<i>glial cells missing homolog 1 (Drosophila)</i>
GJA1	protéine de jonction alpha 1, connexine-43 (Cx43)

GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GTP	guanosine triphosphate
hCG	hormone gonadotrophine chorionique humaine
HERV	rétrovirus endogène humain
HIF1A	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
hPL	hormone lactogène placentaire
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1
HRP	peroxydase de Raifort
HSD17β1	<i>hydroxysteroid (17-β) dehydrogenase 1</i>
HuR	<i>ELAV, embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 1</i>
ICM	masse cellulaire interne
JNK1	<i>c-Jun N-terminal kinase 1, MAPK8</i>
JNK2	<i>c-Jun N-terminal kinase 2, MAPK9</i>
JUN	<i>jun proto-oncogene, AP-1, c-Jun</i>
K-18	cytokératine-18
kb	kilobase
kpb	kilopaires de bases
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LIN-28	<i>lin-28 homolog A (C. elegans)</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

MAPK11	<i>mitogen-activated protein kinase 11, p38β</i>
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14, p38α</i>
MAPK8	<i>mitogen-activated protein kinase 8, JNK1</i>
MAPK9	<i>mitogen-activated protein kinase 9, JNK2</i>
MAPKAPK2	<i>mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>
MED1	<i>mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1</i>
MeOH	méthanol
MFSD2A	<i>major facilitator superfamily domain containing 2A</i>
miARN	microARN
MKK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1, MAP2K1</i>
MMLV	virus de la leucémie murine
MMP2	métalloprotéinase 2
NaF	fluorure de sodium
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NPM1	<i>nucleophosmin 1</i>
nt	nucléotide
O ₂	dioxygène, oxygène
OASIS	<i>old astrocyte specifically-induced substance, CREB3L1</i>
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>

p53	<i>tumor protein p53, TRP53</i>
p68	<i>DDX5, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5</i>
p72	<i>DDX17, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 17</i>
PACT	<i>interferon-inducible double stranded RNA dependent activator</i>
PBS	tampon phosphate salin
PE	prééclampsie
PGH	hormone de croissance placentaire
PI	iodure de propidium
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKA	protéine kinase A
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
<hr/>	
pré-miARNs	miARN précurseur
pri-miARNs	miARN primaire
PS	phosphatidylsérine
PS	phosphatidylsérine
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	polyfluorure de vinyldène
qPCR	réaction en chaine par polymérase quantitative
qRT-PCR	réaction en chaine par polymérase quantitative après transcription inverse
Ran	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>

RBM4	<i>RNA binding motif protein 4</i>
RCIU	retard de croissance intra-utérin
RIPA	tampon de radioimmunoprécipitation
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
SDS	laurylsulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siARN	petit ARN interférant
SMAD	<i>mothers against decapentaplegic homolog (Drosophila)</i>
sncARN	petit ARN non codant
SNIP1	<i>smad nuclear interacting protein 1</i>
Sp1	<i>specificity protein 1 transcription factor</i>
ST	syncytiotrophoblaste
STBM	microparticules syncytiotrophoblastiques
TBS-T	<i>tris buffered saline-tween</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP2	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>
TJP1	protéine de jonction serrée 1, <i>zona occludens 1 (ZO-1)</i>
TORC1	<i>transducer of regulated CREB activity 1, CRTC1</i>
TRBP	<i>trans-activation-responsive RNA-binding protein</i>
Tris	trométhamine

Tris-HCl	chlorhydrate de tris hydroxyméthyl-aminométhane
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>

RÉSUMÉ

Les microARNs (miARNs) participent à la régulation du destin et de la différenciation cellulaire. La littérature fait état d'une variété de miARNs exprimés dans le placenta dont plusieurs sont exprimés uniquement dans les trophoblastes. Par contre, peu de chercheurs ont exploré les fonctions des miARNs dans les cellules placentaires. Dans cette étude, nous avons mis au point une approche fonctionnelle reposant sur l'inhibition d'une enzyme impliquée dans la maturation des miARNs afin d'évaluer l'implication de ceux-ci dans la régulation de la différenciation des trophoblastes *in vitro*. Ainsi, grâce à la technologie de l'ARNi, l'expression protéique de l'enzyme Drosha a été inhibée jusqu'à 80% dans les choriocarcinomes de la lignée BeWo. Suite à l'inhibition de Drosha, une augmentation significative du taux de fusion cellulaire a été mesurée, mais celle-ci n'a pas été accompagnée d'une augmentation de la sécrétion d'hCG par les cellules BeWo. L'activité globale des miARNs favorise donc le maintien des CT dans un état prolifératif. Des analyses de qRT-PCR subséquentes ont révélé que l'augmentation de la fusion cellulaire mesurée était accompagnée d'un accroissement de l'expression du transcrit de Syncytine-2, une protéine fusiogène connue. Des analyses *in silico* réalisées à l'aide des logiciels libres MiRanda et TargetScan ont dévoilé que le transcrit de Syncytine-2 serait la cible d'une vingtaine de miARNs dont plusieurs sont membres des familles miR-17, miR-515 et miR-15. En conclusion, cette étude a permis de confirmer que les miARNs ont un rôle essentiel dans la régulation de la différenciation morphologique des cellules BeWo *in vitro*. Il reste cependant à élucider les mécanismes moléculaires exacts par lesquels les miARNs participent à la différenciation des cellules placentaires.

Mot-clés : placenta, trophoblaste, différenciation, microARNs, fusion, Syncytine-2.

INTRODUCTION

Les microARNs (miARNs) sont une classe de petits ARNs non codants (sncARNs) de 18-22 nucléotides (nt) qui participent à la régulation génique. Chez les Mammifères, ces petits ARNs endogènes hautement conservés dérivent de longs transcrits primaires (pri-miARNs) qui sont d'abord clivés en précurseurs d'environ 70 nt (pré-miARNs) par l'enzyme nucléaire Drosha. Les pré-miARNs sont ensuite exportés dans le cytoplasme où ils parachèvent leur maturation sous l'action de l'enzyme Dicer (Kim, 2005). Les miARNs exercent leur activité régulatrice en se liant à la région non traduite en 3' (3'-UTR) des ARNm via l'appariement de bases. Cet appariement a pour conséquence d'inhiber la traduction des transcrits ciblés (Guo *et al.*, 2010). Malgré que la plupart des miARNs aient un impact modeste sur l'expression protéique des gènes ciblés (Baek *et al.*, 2008), ils peuvent avoir une influence marquée sur les réseaux moléculaires (Mouillet, Chu et Sadovsky, 2011). En outre, un seul miARN peut réguler l'expression d'une multitude de gènes et, inversement, l'expression d'un gène peut être régulée par plus d'un miARN à la fois. Bien qu'un grand nombre de miARNs soient exprimés de manière ubiquitaire, plusieurs d'entre eux démontrent des patrons d'expression spécifiques à un stade du développement, à un organe ou encore à un type cellulaire (Newman et Hammond, 2010). De surcroît, il a été démontré que le patron d'expression des miARNs reflète l'état pathophysiologique d'un tissu : leur expression est altérée dans plusieurs pathologies dont le diabète et le cancer. Par conséquent, depuis leur découverte, les miARNs ont été la source d'un grand intérêt biotechnologique. De nombreuses équipes de chercheurs ont en effet tenté de découvrir des miARNs pouvant faire fonction de biomarqueurs ou encore d'utiliser ceux-ci comme outils thérapeutiques (Ebert et Sharp, 2010b).

Le placenta est un organe transitoire d'origine embryonnaire qui exprime un nombre important de miARNs spécifiques (Luo *et al.*, 2009 ; Mouillet, Chu et Sadovsky, 2011). Leur rôle est cependant encore peu connu dans le placenta. Jusqu'à tout récemment, la plupart des études publiées avaient pour but de les cataloguer ou encore d'examiner les différences dans l'expression des miARNs entre les placentas de grossesses normales ou compliquées

par diverses pathologies de grossesse. Cette étude vise plutôt à démontrer l'implication des miARNs dans la régulation de la différenciation morphologique des trophoblastes humains *in vitro*. La fusion cellulaire prenant place chez les cellules placentaires permet la formation et le maintien du syncytiotrophoblaste (ST). Ce syncytium constitue la barrière fœto-maternelle : il est en contact direct avec le sang maternel. En plus d'assurer la gestion des nutriments et des déchets métaboliques fœtaux ainsi que le transport d'oxygène, le ST sécrète de nombreuses hormones, facteurs de croissance et cytokines impliqués dans la croissance fœtoplacentaire ainsi que dans l'adaptation du métabolisme maternel à la grossesse. Par conséquent, la fusion appropriée et coordonnée des trophoblastes est donc cruciale pour une grossesse saine (Gauster *et al.*, 2009 ; Huppertz, Bartz et Kokozidou, 2006).

Enfin, il a été rapporté que l'expression de nombreux miARNs est perturbée chez les placentas de grossesses compliquées par la prééclampsie (PE) (Enquobahrie *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2009 ; Mayor-Lynn *et al.*, 2010 ; Pineles *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2009) et le retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Mouillet *et al.*, 2010 ; Prieto et Markert, 2011). Selon le modèle proposé, un dysfonctionnement placentaire serait responsable de l'apparition de ces deux pathologies idiopathiques communes (Aplin, 2010). Huppertz (2008) affirme d'ailleurs qu'un échec de la différenciation précoce du trophoblaste villositaire serait à l'origine de la PE. Conséquemment, une meilleure compréhension des régulateurs de la différenciation morphologique des cellules placentaires pourrait permettre d'acquérir davantage de connaissances quant aux mécanismes moléculaires responsables de l'apparition de ces pathologies

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Le placenta est un organe transitoire permettant à l'embryon puis au fœtus de survivre dans les limites de l'environnement intra-utérin. La diversité des fonctions assurées par le placenta est importante, allant de l'implantation de l'embryon jusqu'à permettre le transport des nutriments entre la mère et le fœtus (Maltepe, Bakardjiev et Fisher, 2010). Comme tous les organes, le placenta remplit ses fonctions par l'intermédiaire d'une multitude de cellules spécialisées issues de la lignée trophoblastique (Armant, 2005 ; John et Hemberger, 2012).

1.1 Formation du placenta

1.1.1 Stade pré-implantatoire et pré-lacunaire

Durant la période de pré-implantation, 3 à 4 jours suivant la fécondation, deux populations cellulaires sont formées chez l'embryon : le trophoctoderme et la masse cellulaire interne (ICM) ou embryoblaste (EB) (Watson et Cross, 2005). Le trophoctoderme consiste alors en une monocouche de cellules épithéliales polarisées qui forment une sphère renfermant l'ICM (Kuckenbergh, Kubaczka et Schorle, 2012 ; Oda, Shiota et Tanaka, 2006). Par la suite, durant la période d'implantation, les cellules du trophoctoderme polaire, c'est-à-dire les cellules immédiatement en contact avec l'ICM, se différencient en deux lignées cellulaires distinctes (James, Carter et Chamley, 2012 ; Simmons et Cross, 2005). Cette différenciation du trophoctoderme prend place immédiatement avant l'invasion de la décidue maternelle et semble être stimulée par le processus d'adhésion à la paroi utérine (Figure 1.1A) (Armant, 2005). Les deux populations établies sont des cytotrophoblastes (CT) qui

forment l'assise interne et le syncytiotrophoblaste (ST) qui constitue l'assise externe (Baergen, 2011b ; Evain-Brion, 2001). Ce premier ST est formé par la fusion cellule-cellule des domaines basolatéraux des cellules trophoblastiques de la couche cellulaire externe du blastocyste. Cet évènement est unique puisque le phénomène de fusion syncytiale du type cellule-cellule ne se produit qu'au moment de l'implantation (Potgens *et al.*, 2002).

1.1.2 Stade lacunaire et vilieux

L'implantation du blastocyste au jour 6 (J6) est la première étape du processus de placentation. À ce stade, le ST est très invasif. Il pénètre l'épithélium utérin et envahit l'endomètre grâce à son activité protéolytique. Il en résulte alors la nidation du blastocyste (Figure 1.1B) (Evain-Brion, 2001 ; James, Carter et Chamley, 2012). Vers le 8^e jour (J8), des vacuoles apparaissent dans la masse syncytiale. Ces vacuoles vont se développer puis former des lacunes, précurseurs de l'espace intervilloux (Figure 1.1C) (Huppertz, 2008).

Après la phase initiale de nidation (J12), les CT commencent à pénétrer au travers de la masse syncytiale. Ils colonisent d'abord le ST interlacunaire, puis atteignent le côté maternel de la masse syncytiotrophoblastique quelques jours plus tard (J15) (Huppertz, 2008). Cette première vague proliférative forme ainsi l'ébauche de la villosité chorale, l'unité structurale et fonctionnelle du placenta (Figure 1.1D) (Benirschke, Burton et Baergen, 2012b ; Evain-Brion, 2001).

À ce stade du développement, les CT mononucléaires indifférenciés résident dans deux types de villosités : les villosités flottantes (interlacunaires) et les villosités crampons (en contact avec la décidue maternelle). Ces cellules vont dès lors se différencier selon deux voies. Dans les villosités crampons, les CT prolifératifs se différencient et envahissent profondément l'endomètre, atteignant le premier tiers du myomètre adjacent. Cette population de cellules invasives nommées trophoblastes extra-villoux (EVT) a la capacité de remodeler l'endomètre et sa vasculature (Benirschke, Burton et Baergen, 2012c ; Jurisicova, Detmar et Caniggia, 2005). Cette invasion est nécessaire puisque le remodelage des artères spiralées maternelles génère un système de faible résistance vasculaire qui permet, à partir de la huitième semaine de grossesse, un apport continu et adéquat de sang pour répondre aux besoins grandissants du fœtus en développement (Baczyk *et al.*, 2009 ; Benirschke, Burton et Baergen, 2012c).

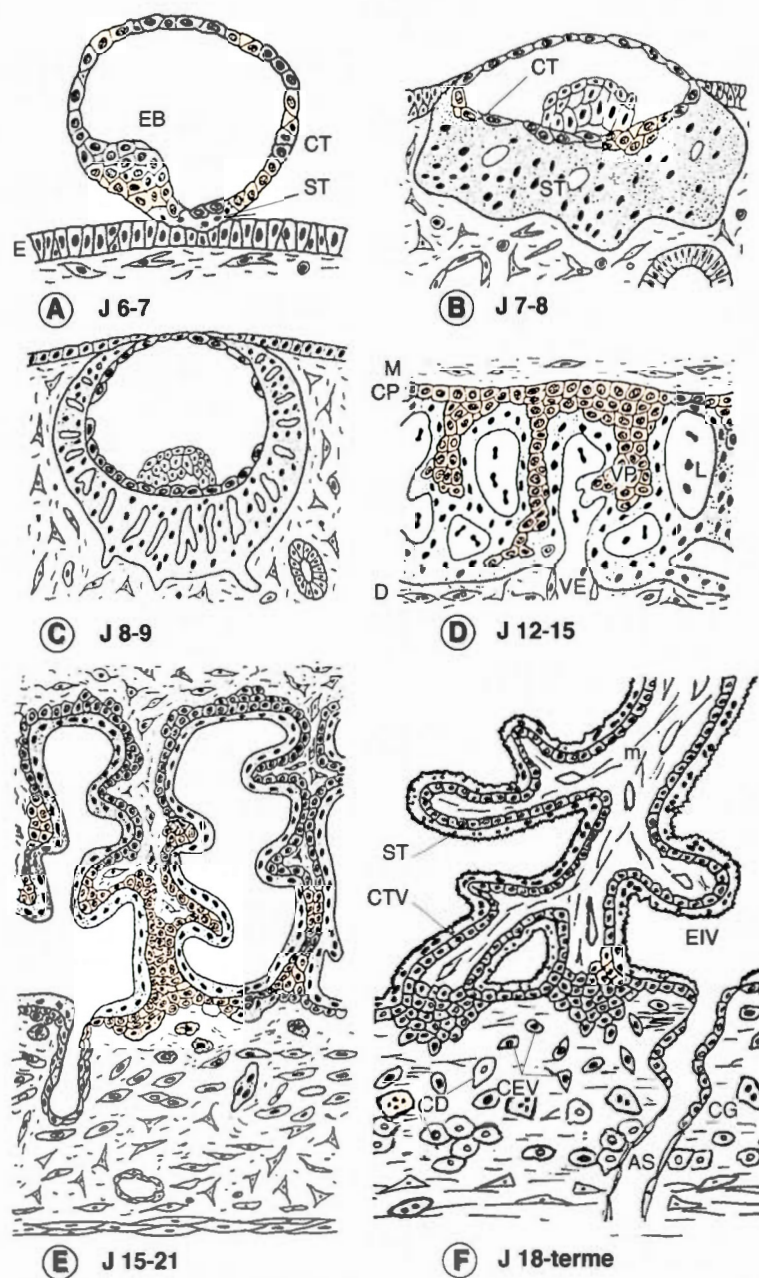


Figure 1.1 Schéma simplifié des principaux stades du développement placentaire humain.

A et B : stades pré-lacunaires ; C : stade lacunaire ; D : stade de transition entre les stades lacunaire et villositaire primaire ; E : stade villositaire secondaire ; F : stade villositaire tertiaire. E : épithélium endométrial ; EB : embryoblaste ; CT : cytotrophoblaste ; ST : syncytiotrophoblaste ; M : mésoderme ; CP : plaque chorale ; L : lacune ; VP : villosité primaire ; VE : vaisseau endométrial ; D : décidue ; m : mésenchyme ; CTV : CT villositaire ; CEV : CT extravillous ; EIV : espace intervillous ; CD : cellule déciduale ; CG : cellule géante ; AS : artère spirale (Alsat *et al.*, 1999).

Au même moment, dans les villosités flottantes, les CT se différencient en trophoblaste villex. Le trophoblaste villex recouvre la villosité chorale dans sa structure définitive. Pour ce faire, les colonnes de CT présentes dans les villosités précoces sont à leur tour envahies par une prolifération mésenchymateuse d'origine embryonnaire au jour 21 (Figure 1.1E), permettant la croissance de la villosité qui se ramifie (Baergen, 2011b ; Evain-Brion, 2001). Quelques jours plus tard, les vaisseaux fœtaux se développent à l'intérieur de l'axe mésenchymateux nouvellement formé (Herr *et al.*, 2010 ; Kingdom *et al.*, 2000). Dans sa structure définitive, la villosité chorale est donc formée de tissu mésenchymateux contenant les vaisseaux fœtaux couverte d'une couche de cellules épithéliales mononucléées reposant sur une membrane basale, les CT villex. Ces cellules fusionnent et maintiennent le ST qui constitue la couche cellulaire externe de la villosité (Figure 1.1F) (Baergen, 2011b ; Benirschke, Burton et Baergen, 2012b ; Evain-Brion, 2001).

1.2 La fusion chez les trophoblastes

Le ST se développe uniquement par l'incorporation continue des CT dans le ST sus-jacent et par la fusion des membranes plasmiques (Huppertz, Bartz et Kokozidou, 2006). La fusion des trophoblastes ne peut être observée que chez les espèces qui présentent une placentation endothélio- ou hémochoriale comme l'humain (Potgens *et al.*, 2002). Fait intéressant, d'autres événements de fusion sont essentiels au développement des mammifères. Les myoblastes fusionnent afin de former des fibres squelettiques multinucléées alors que les cellules d'origine monocyttaire fusionnent pour former des ostéoclastes qui participent à la formation et au remodelage des os ainsi qu'à la régulation des concentrations sériques de calcium (Larsson, Bjerregaard et Talts, 2008).

1.2.1 Initiation du processus de fusion cellulaire

Bien que la différenciation des CT en ST soit essentielle à la croissance du placenta, la provenance du signal initiant la fusion cellulaire est toujours inconnue (CT ou ST) (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a). Il a été suggéré que ce signal proviendrait du ST : il serait activé d'endroits circonscrits du ST en réponse à un besoin de matériel frais en provenance des CT (Huppertz et Gauster, 2011). Par contre, il a été constaté *in vitro* que les CT fusionnent entre eux pour générer un nouveau ST si celui-ci est sévèrement stressé ou

endommagé (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a). Ainsi, le signal provenant du ST pourrait être un signal inhibiteur plutôt qu'activateur de la fusion cellulaire (Huppertz et Gauster, 2011). Également, il n'est pas à écarter que le signal pourrait être régulé de manière temporelle en plus d'être activé en réponse à un stress ou le besoin de revitaliser le ST (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a). Enfin, un nombre important d'hormones, de cytokines et de facteurs de croissance ont été identifiés *in vitro* comme régulant la différenciation des trophoblastes primaires ou des cellules de lignées trophoblastiques (Gauster *et al.*, 2009 ; Handwerger, 2010 ; Huppertz et Gauster, 2011 ; Vaillancourt *et al.*, 2009).

1.2.2 Aperçu général du processus de fusion cellulaire

Il a été démontré qu'une augmentation de la quantité d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est l'un des principaux moteurs de la différenciation des CT en ST (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a ; Strauss *et al.*, 1992 ; Wice *et al.*, 1990). Celle-ci mène à l'activation des protéines effectrices PKA (protéine kinase A) et Epac1 (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*) (Orendi *et al.*, 2010 ; Yoshie *et al.*, 2010). Les voies de signalisation des protéines MAPK, particulièrement les protéines ERK1/2 et p38 ont également été impliquées dans la différenciation des trophoblastes (Daoud *et al.*, 2005 ; Delidakis *et al.*, 2011 ; Vaillancourt *et al.*, 2009). L'activation de ces voies de signalisation pousse le CT sous-jacent au ST à proliférer et à se diviser. La cellule fille générée est poussée à sortir du cycle cellulaire et commence à accumuler des ARNs, des protéines et des organelles en préparation de la fusion (Huppertz, 2006). Le programme de différenciation des CT en ST implique la transcription et l'expression de facteurs fusiogènes spécifiques, l'augmentation de l'expression des protéines de jonctions cellulaires, le basculement des phosphatidylsérine (PS) à la surface cellulaire ainsi que le remodelage du cytosquelette (Figure 1.2) (Gauster *et al.*, 2009).

1.2.3 Facteur de transcription GCM1

Les CT villositaires quittent le cycle cellulaire et amorcent alors leur programme de différenciation. Chez ces CT villositaires destinés à fusionner avec le ST (Baczyk *et al.*, 2009), la sortie du cycle cellulaire augmente l'expression et stimule l'activité du facteur de transcription

Glial Cell Missing Homolog 1 (GCM1) (Huppertz et Gauster, 2011). L'expression de GCM1 est sous le contrôle transcriptionnel de OASIS/CREB3L1 ainsi que de CREB et de son coactivateur TORC1/CRTC1 (Delidakis *et al.*, 2011 ; Schubert *et al.*, 2008). Son activité transcriptionnelle est quant à elle étroitement régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation et sumoylation) (Chang, Chang et Chen, 2011 ; Chang *et al.*, 2005 ; Chiang *et al.*, 2009 ; Chuang *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2011) en réponse à l'activation de la voie de l'AMPc (Chang, Chang et Chen, 2011) et à la tension en oxygène (Chiang *et al.*, 2009).

L'expression de ce facteur de transcription spécifique aux trophoblastes (Chang *et al.*, 2008) est nécessaire à la formation du ST (Baczyk *et al.*, 2009). Dans le placenta humain, GCM1 régule la transcription de la protéine de jonction alpha 1 (GJA1) aussi nommée Connexine 43 (Cx43) (Schubert *et al.*, 2008) ainsi que la transcription des glycoprotéines membranaires Syncytine-1 (ERVWE1) (Muroi *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2002), Syncytine-2 (ERVFRDE1) et son récepteur membranaire MFSD2A (*Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2A*) (Liang *et al.*, 2010). Enfin, un motif de liaison à GCM1 a également été rapporté dans le promoteur de la sous-unité alpha du gène codant la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) (Baczyk *et al.*, 2009), une hormone importante dans la formation de syncytia (Yang, Lei et Rao *Ch*, 2003).

1.2.4 Protéines de jonctions cellulaires

L'échange direct de petites molécules, d'ions et de messagers secondaires comme l'AMPc et les ions Ca^{2+} entre les cellules avoisinantes permettrait de coordonner le processus de fusion. La fusion des trophoblastes requiert la présence de jonctions communicantes formées par un hexamère de protéines GJA1/Cx43 entre le CT et le ST (Cronier *et al.*, 2003 ; Frendo *et al.*, 2003a). GJA1 est la seule protéine de jonction exprimée dans les trophoblastes villos (Malassine, Frendo et Evain-Brion, 2010) et son expression augmente lors de la différenciation des CT (Pidoux *et al.*, 2010). Il a récemment été démontré que l'activité de la protéine GJA1 sur l'inhibition de la prolifération et la fusion cellulaire chez les cellules BeWo était dépendante de sa queue cytoplasmique. Celle-ci contient plusieurs sites de phosphorylation par les protéines kinases et permet la liaison de la protéine TJP1/ZO-1 (Dunk *et al.*, 2012).

Comme GJA1, TJP1 est localisée à la jonction entre les CT et le ST ainsi qu'entre les CT (Marzioni *et al.*, 2001). Fait intéressant, cette protéine est fortement exprimée lors de la différenciation des CT et son expression diminue rapidement suivant la formation de syncytia *in vitro* (Malassine, Frendo et Evain-Brion, 2010). Une diminution de l'expression de TJP1 réduit l'expression de GJA1 et la fusion des trophoblastes. Enfin, différents rôles ont été proposés pour l'interaction de GJA1 avec TJP1. Leur interaction pourrait être entre autres impliquée dans la formation, la localisation et l'activité des jonctions communicantes (Pidoux *et al.*, 2010).

D'ailleurs, Dunk *et al.* (2012) ont récemment démontré que GJA1 interagit avec le récepteur de Syncytine-1 (Kudo et Boyd, 2002) via leurs domaines transmembranaires. ASCT2 (également désigné SLC1A5/RDR/ATB0) est un transporteur d'acides aminés neutres exprimé dans la plupart des tissus humains. Dans le placenta, il est exprimé principalement dans les CT (Esnault *et al.*, 2008). L'activation de PKA a été démontrée comme stimulant la phosphorylation de GJA1. Ceci induit la formation de jonctions communicantes entre le CT et le ST et l'association de TJP1 avec la queue cytoplasmique de GJA1. L'interaction de GJA1 avec ASCT2 dans la membrane basale du ST permettrait donc d'amener ASCT2 à proximité de Syncytine-1 et stimulerait la fusion du CT avec le syncytium (Dunk *et al.*, 2012).

1.2.5 Glycoprotéines membranaires d'origine rétrovirale

Les protéines Syncytine-1 et -2 sont exprimées uniquement dans les trophoblastes, les ostéoclastes et les myocytes. Le patron d'expression tissu-spécifique de ces protéines membranaires contribuerait à la spécificité du processus de fusion (Larsson, Bjerregaard et Talts, 2008 ; Potgens *et al.*, 2002). Il a été démontré que l'épissage inefficace du transcrit de Syncytine-1 et -2 combiné à la méthylation des îlots CpG et la modification des histones inhibent l'expression de ces protéines dans les cellules non placentaires (Liang *et al.*, 2010 ; Trejbalova *et al.*, 2011). Un rôle direct dans la différenciation et la fusion des CT villosa a été mis en évidence pour ces protéines (Frendo *et al.*, 2003b ; Rote, Chakrabarti et Stetzer, 2004 ; Vargas *et al.*, 2009).

1.2.5.1 Syncytine-1 et ASCT2

La Syncytine-1 a été désignée par Ruebner *et al.* (2010) comme étant la protéine cardinale de la fusion cellulaire. À cet effet, il a été rapporté que Syncytine-1 participe également à la fusion cellulaire prenant place dans les myocytes (Larsson, Bjerregaard et Talts, 2008) et les ostéoclastes (Soe *et al.*, 2011). Elle a d'ailleurs été impliquée dans la fusion des cellules endothéliales cancéreuses et des cellules du cancer du sein (Bjerregaard *et al.*, 2006 ; Larsson *et al.*, 2007 ; Larsson, Holck et Christensen, 2007). La fusion de type cellule-cellule dans les tumeurs peut contribuer à l'aneuploïdie et promeut le développement graduel de tumeurs malignes (Trejbalova *et al.*, 2011).

La Syncytine-1 lie le récepteur rétroviral mammalien de type D ASCT2 (*Sodium-Dependent Neutral Amino Acid Transporter Type 2*) (Blond *et al.*, 2000) et peut utiliser ASCT1/SLC1A4, un autre transporteur d'acides aminés neutres, comme récepteur auxiliaire (Lavillette *et al.*, 2002). Contrairement à la Syncytine-1 (Delidaki *et al.*, 2011 ; Muroi *et al.*, 2009 ; Prudhomme, Oriol et Mallet, 2004 ; Ruebner *et al.*, 2012), l'activation de la voie de l'AMPc n'induit pas l'expression de ASCT2 (Potgens *et al.*, 2004). Par conséquent, la régulation de l'expression de Syncytine-1, et non de ASCT2 (Hayward *et al.*, 2007), semble être une étape critique dans la fusion des cellules placentaires (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a ; Chang *et al.*, 2005). D'ailleurs, l'inhibition spécifique de l'expression de Syncytine-1 résulte en une diminution de la fusion et de la différenciation des trophoblastes (Frendo *et al.*, 2003). Dans le placenta, la localisation de la Syncytine-1 est controversée (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a ; Huppertz et Gauster, 2011 ; Potgens *et al.*, 2004). La protéine a été détectée dans le ST, les CT et les EVT (Holder *et al.*, 2012b). Syncytine-1 est fortement exprimée dans le placenta, particulièrement lors du premier trimestre (Holder *et al.*, 2012a). Malassiné *et al.* (2010) ont rapporté que son expression augmente lors de la différenciation des CT primaires en culture. Enfin, une diminution de l'expression - tant au niveau protéique que de l'ARNm - des glycoprotéines d'origine rétrovirale Syncytine-1 et -2 a été rapportée dans les placentas obtenus de grossesses compliquées par la PE (Vargas *et al.*, 2012) et le RCIU (Ruebner *et al.*, 2010).

1.2.5.2 Syncytine-2 et MFSD2

La Syncytine-2 a été localisée seulement dans les CT des villosités chorioniques (Malassine *et al.*, 2007 ; Vargas *et al.*, 2009). Elle est fortement exprimée dans les CT en différenciation et son expression diminue rapidement après la formation de syncytia *in vitro* (Malassine *et al.*, 2008). Également, en plus du rôle important de la Syncytine-2 dans la fusion des cellules placentaires (Liang *et al.*, 2010 ; Vargas *et al.*, 2009), il a été démontré qu'elle possède un rôle immunosuppresseur (Mangeney *et al.*, 2007).

Le récepteur de la Syncytine-2 a été identifié comme étant MFSD2A. Ce transporteur putatif d'hydrates de carbone (Esnault *et al.*, 2008) est exprimé abondamment dans le placenta ainsi qu'à un moindre degré dans le testicule et l'intestin. Ce patron d'expression est étonnant puisqu'un transporteur de métabolites est généralement exprimé de manière ubiquitaire (Trejbalova *et al.*, 2011). L'expression de MFSD2A peut, comme Syncytine-2, être fortement induite par l'activation de la voie de l'AMPc (Delidakis *et al.*, 2011). Dans le placenta, MFSD2A est exprimé dans le ST (Ruebner *et al.*, 2010) et y présente une distribution piquetée dans le cytoplasme avec une présence prononcée à la membrane (Toufaily *et al.*, 2013). Par conséquent, la régulation de l'expression et de la localisation de MFSD2A pourrait contribuer à réguler les événements de fusion prenant place entre les CT et le ST.

1.2.6 Externalisation des phosphatidylsérines

La différenciation des CT villex résulte en la redistribution des phospholipides de la membrane plasmique avec un basculement des PS à la surface cellulaire (Das *et al.*, 2004). La PS est le phospholipide le plus abondant dans la membrane plasmique. Il est normalement distribué de manière asymétrique : ce phospholipide est presque entièrement présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Cette distribution est activement maintenue par des translocases ATP-dépendantes qui transportent de manière sélective les PS errants du feuillet externe de la membrane plasmique au feuillet interne. Le basculement des PS se produit généralement durant l'apoptose et agit comme signal pour le retrait des cellules mourantes (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a).

Le basculement des PS est essentiel à la fusion cellulaire, tant lors de la formation du ST que lors de la fécondation ainsi que la formation de myotubes et d'ostéoclastes (Rote *et al.*, 2010). Dans le placenta, ce phénomène est observé chez un sous-groupe de CT hautement différenciés (Huppertz et Gauster, 2011). Le basculement des PS est le fait de transporteurs ATP- et PKA-dépendants (Rote *et al.*, 2010). Huppertz et Gauster (2011) ont également rapporté que le clivage de la α -fodrine par la caspase-8 serait un second mécanisme responsable du basculement des PS. Cette protéine du cytosquelette possède des sites de liaison aux PS et pourrait être impliquée dans la séquestration de ces molécules dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Par contre, en raison de la faible avidité ainsi que du nombre de sites de liaison de la fodrine aux PS, le clivage de cette protéine n'est pas suffisant pour expliquer le basculement des PS observé lors de la fusion. Enfin, en raison de la structure des protéines fusiogènes, le basculement des PS permettrait la réorientation de ces protéines afin de les insérer dans la membrane plasmique d'une cellule avoisinante (Huppertz et Gauster, 2011).

1.2.7 Remodelage du cytosquelette

Le remodelage du cytosquelette rend la membrane plasmique flexible et les cellules compétentes à fusionner. Shibukawa *et al.* (2010) ont démontré que l'inhibition de la Calponine 3 (CNN3) promeut le réarrangement du cytosquelette d'actine et la formation de syncytia dans les cellules BeWo (Shibukawa *et al.*, 2010). La fusion cellulaire chez les CT est également accompagnée de l'inhibition de l'expression du transcrit ainsi que du clivage de la α -fodrine. Le réseau de spectrine/fodrine maintient la courbure de la membrane plasmique : le clivage de la fodrine facilite donc la fusion puisqu'une augmentation de la courbure de la membrane augmente le potentiel fusiogène (Huppertz et Gauster, 2011). La caspase-8 serait responsable du clivage de cette protéine. Il a été démontré que la forme active de la caspase-8 co-localise avec la α -fodrine dont l'expression diminue rapidement dans les CT et disparaît complètement dans le ST (Gauster et Huppertz, 2010). L'activation de la caspase-8 se produit dans les CT hautement différenciés, juste avant la fusion avec le ST (Gauster, Siwetz et Huppertz, 2009). L'activation des caspases, particulièrement la caspase-8, a été démontré comme n'étant pas nécessaire pour la différenciation des CT villosus en ST (Guilbert, Riddell et Winkler-Lowen, 2010). La forme inactive de la caspase-8 est quant à elle exprimée dans les CT villosus lors du premier trimestre. Il a été avancé que celle-ci,

contrairement à sa forme active, pourrait avoir un rôle dans la différenciation des CT (Guilbert, Riddell et Winkler-Lowen, 2010 ; Huppertz et Gauster, 2011). À ce sujet, des complexes de procaspase-8 avec des facteurs qui favorisent l'activation de la voie NF- κ B mèneraient à l'induction de la production de hCG (Rote *et al.*, 2010). White *et al.* (2009) ont également démontré que la caspase-14 inhibe la différenciation des CT en régulant l'expression de l'hormone hCG ainsi que l'expression de la protéine cytokératine-18 (K-18), une protéine des filaments intermédiaires.

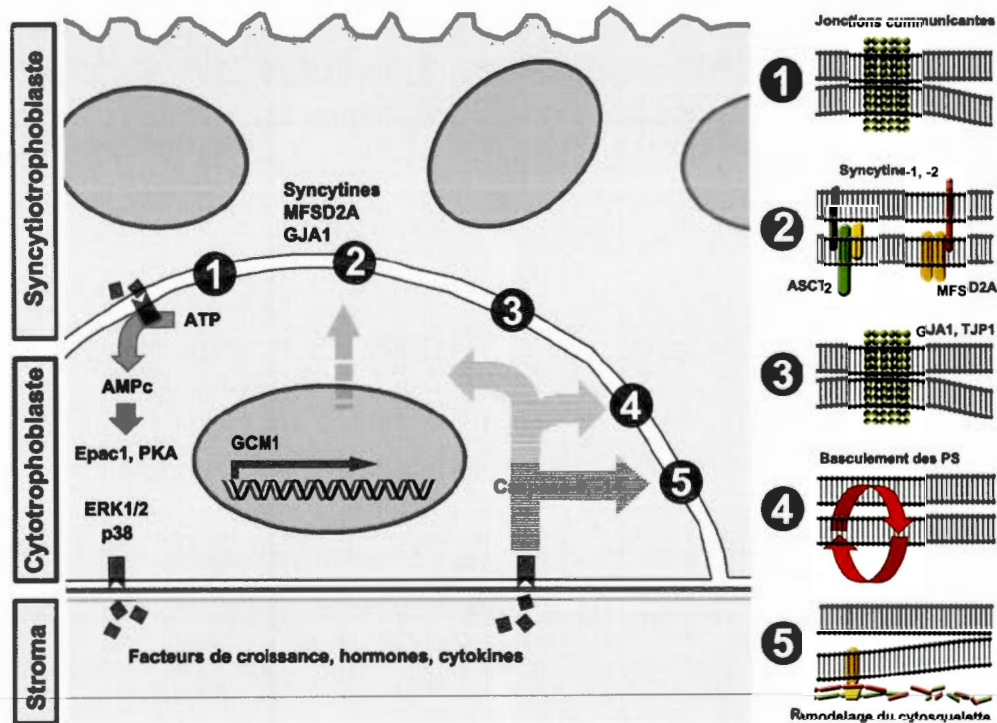


Figure 1.2 Représentation des évènements prenant place lors de la différenciation d'un CT en ST.

La différenciation d'un CT en ST est stimulée par la liaison d'un ou de plusieurs facteurs de croissances, hormones, cytokines présentes dans l'environnement maternel et/ou fœtal à leur récepteur. Ceci mène à l'activation de la voie de l'AMPc ainsi que la voie des MAPK ERK1/2 et p38. La présence de jonctions communicantes permet l'échange direct d'ions et de messagers secondaires entre les cellules avoisinantes afin de coordonner le processus de fusion (1). Le CT prolifère alors et la cellule fille quitte le cycle cellulaire. L'activation de la voie de l'AMPc stimule l'expression et l'activité du facteur de transcription GCM1 qui promeut à son tour l'expression de protéines fusiogènes dont Syncytine-1, Syncytine-2 et son récepteur MFSD2A (2). GCM1 stimule également l'expression de GJA1 qui interagit avec TJP1 et ASCT2 (3). Les PS basculent du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique (4) et la forme activée de la caspase-8 clive la α -fodrine afin de remodeler le cytosquelette (5). Image tirée de Gauster *et al.* (2009).

1.3 Le syncytiotrophoblaste

1.3.1 Morphologie et fonctions du syncytiotrophoblaste

Le ST est l'interface placentaire séparant le sang maternel et fœtal. Ininterrompu, ce syncytium recouvre entièrement l'espace intervilloux (Gauster *et al.*, 2009). Le ST est responsable du transport de l'oxygène et des nutriments (glucose, acides aminés, eau, ions, minéraux, vitamines, etc.) de la mère au fœtus et de l'élimination des déchets (CO₂, déchets métaboliques, ions, lipides, etc.) du métabolisme fœtal vers la circulation maternelle (Baergen, 2011a). La surface apicale du ST en contact avec le sang maternel est couverte par des microvillosités créant ainsi une énorme surface de contact qui atteint environ 92 m² à la fin de la grossesse (Lafond et Simoneau, 2006). Durant les stades précoces de la grossesse, le ST est plus ou moins homogène avec des noyaux et des organelles également distribués. À partir de la 15^e semaine de grossesse et jusqu'à terme, cette situation change graduellement pour laisser place à une grande diversité structurale variant en termes d'épaisseur du syncytium, de la distribution des noyaux, du type et du nombre d'organelles et de l'activité enzymatique à un endroit donné (Figure 1.3). Plusieurs études proposent que ces régions spécialisées correspondent à différents stades de la cascade apoptotique qui s'enclenche au moment de la fusion syncytiale (Benirschke, Burton et Baergen, 2012a).

Le ST est également la cellule endocrine du placenta. Il est capable de sécréter de la progestérone, des œstrogènes, de la hCG, de l'hormone lactogène placentaire (hPL), de l'hormone de croissance placentaire (PGH) ainsi qu'un grand nombre de facteurs de croissance, cytokines et autres peptides impliqués dans la croissance fœtoplacentaire et l'adaptation de la physiologie maternelle à la grossesse (Baergen, 2011a ; Evain-Brion, 2001 ; Gauster et Huppertz, 2010).

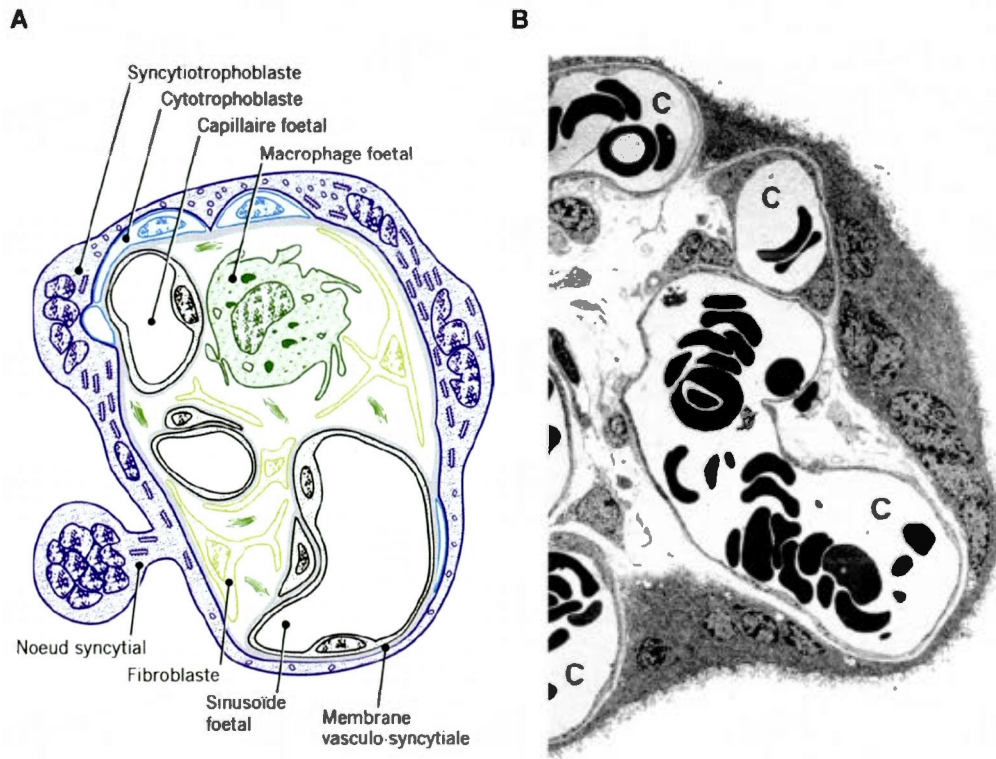


Figure 1.3 Illustrations des régions spécialisées de la surface villueuse.

A) Représentation simplifiée d'une coupe transversale d'un villus terminal représentant la variabilité structurale de la couche syncytiotrophoblastique. B) Transmission électronique d'une section microscopique d'un villus terminal démontrant la spécialisation structurale du ST en relation à la position des capillaires fœtaux (C). Le ST est atténué jusqu'à former des membranes vasculo-syncytiales dépourvues de noyaux aux endroits où les capillaires fœtaux font saillie alors que les noyaux s'accumulent et forment des nœuds syncytiaux entre les membranes formées. Images tirées de Benirschke *et al.* (2006).

1.3.2 L'extrusion de matériel trophoblastique par le placenta

La face maternelle du placenta est un épithélium stratifié (Baergen, 2011a). Comme tout épithélium stratifié, lorsque des régions du ST sont âgées ou endommagées, elles sont alors extrudées dans la circulation maternelle sous forme de structures multinucléées enveloppées. D'abord observée dans les poumons de femmes décédées d'éclampsie (Lapaire *et al.*, 2007), l'extrusion de matériel trophoblastique est considérée dès 1901 comme un phénomène normal et physiologique au cours de la grossesse (Askelund et Chamley, 2011). La quantité de matériel déporté est estimée à environ 100 000 particules de débris par jour et peut atteindre jusqu'à quelques grammes à terme (Burton et Jones, 2009). Les mécanismes par lesquels les débris sont relâchés dans la circulation maternelle sont encore aujourd'hui inconnus (Askelund et Chamley, 2011 ; Burton, 2011).

Un large éventail de structures trophoblastiques est relâché dans la circulation maternelle durant la grossesse. Parmi celles-ci on retrouve des bourgeons syncytiaux, des CT mononucléés, des fragments anucléaires, des microparticules syncytiotrophoblastiques (STBM), des exosomes ainsi que de l'ADN et de l'ARN libre (Askelund et Chamley, 2011 ; Benirschke, Burton et Baergen, 2012d). Le matériel trophoblastique libéré dans l'espace intervilloux entre dans la circulation maternelle via les veines utérines (Benirschke, Burton et Baergen, 2012c). Il voyage alors via les veines iliaques jusqu'à la veine cave supérieure puis à travers les artères cardiaque et pulmonaire (Askelund et Chamley, 2011). Dans les poumons, le matériel trophoblastique extrudé s'engage dans les capillaires où les structures les plus importantes y restent piégées. Les cellules et les bourgeons syncytiaux coincés dans les poumons entrent alors en apoptose (Benirschke et Willes, 2010), libérant de l'ADN nucléaire fœtal qui entre alors la circulation maternelle comme ADN circulant. Les débris doivent être rapidement évacués afin de prévenir l'obstruction de la circulation pulmonaire durant la grossesse. Dans les poumons, l'évacuation est effectuée par des phagocytes non professionnels, probablement les cellules endothéliales. Enfin, les fragments de petite taille ayant rejoint la circulation maternelle périphérique seraient rapidement ingérés par les phagocytes avec lesquels ils entrent en contact (Askelund, Chamley et Pantham, 2011).

En terminant, le matériel trophoblastique libéré pourrait jouer un rôle dans la production d'hormones et la coagulation sanguine ou pourrait simplement représenter une manière de se débarrasser du matériel dégénéré. Fait intéressant, il pourrait jouer un rôle important dans l'établissement de la tolérance du système immunitaire maternel aux

antigènes fœtaux. L'étude de l'interaction du matériel trophoblastique libéré avec le système immunitaire maternel pourrait donc être la clé permettant de comprendre comment le fœtus survit durant neuf mois comme un greffon (Askelund, Chamley et Pantham, 2011 ; Holder *et al.*, 2012b ; Warning, McCracken et Morris, 2011).

1.3.3 Transcription dans le syncytiotrophoblaste

Le grand nombre de noyaux présents dans le ST, leur morphologie ainsi que la nature de ce tissu a soulevé des questions concernant leur activité. L'apparence des noyaux à l'intérieur du ST varie selon l'âge gestationnel (Burton et Jones, 2009). Tôt dans la grossesse, ils ont une taille réduite, une enveloppe nucléaire plus convolutive, une apparence euchromatique et sont aléatoirement dispersés. Également, environ 50% des noyaux possèdent alors un nucléole (Fogarty *et al.*, 2011). À l'opposé, vers le terme de la grossesse, plusieurs noyaux présentent des agrégations d'hétérochromatine très denses et la plupart n'ont plus de nucléole. Il a d'abord été proposé que les noyaux à l'intérieur du ST sont transcriptionnellement inactifs (Benirschke *et al.*, 2006) : les ARNm nécessaires au ST proviendraient donc de la fusion des CT. Par contre, plusieurs ARNm, par exemple ceux codant pour la hPL, sont retrouvés uniquement dans le ST (Burton et Jones, 2009). Fogarty *et al.* (2011) ont récemment confirmé la présence de noyaux transcriptionnellement actifs dans le ST à l'aide de la technique d'immunohistochimie. Ils ont constaté que la proportion de noyaux inactifs varie entre 20 et 40%. Une distribution inégale de ces deux populations a été observée à l'intérieur du ST : des régions étudiées contenaient seulement des noyaux actifs, ou l'inverse. La proportion de noyaux transcriptionnellement actifs et inactifs reste cependant constante tout au long de la grossesse (ratio 3,9 : 1), malgré que le nombre de noyaux totaux augmente exponentiellement au cours de celle-ci. Cette découverte suggère que le nombre de noyaux actifs est étroitement régulé. Cette régulation pourrait s'exercer au niveau de la différenciation des CT et de leur fusion subséquente avec le ST, ou encore à travers l'agrégation de noyaux condensés dans les nœuds syncytiaux (Fogarty *et al.*, 2011).

En résumé, la formation et le maintien du ST sont essentiels à une grossesse saine. Le ST est maintenu par la fusion continue d'une population de CT hautement différenciés avec le ST. Afin d'étendre notre compréhension de ce processus complexe, nous avons cherché à découvrir l'implication d'un groupe de petits ARNs non codants dans la régulation de la fusion des cellules placentaires.

1.4 Les microARNs

Les miARNs sont de petits ARNs non codants d'environ 22 nt qui régulent de façon post-transcriptionnelle l'expression génique. Ces petits ARNs se lient à des protéines effectrices afin de cibler des ARNm spécifiques via l'appariement de bases (Carthew et Sontheimer, 2009) (Classification des ARN non codants, Appendice A). Découverts chez *Caenorhabditis elegans* au début des années 2000 (Muljo, Kanellopoulou et Aravind, 2010), il y a aujourd'hui plus d'un millier de séquences de miARNs recensées chez l'humain dans la base de données miRBase (www.mirbase.org) (Système d'annotation des miARNs, Appendice B). Des études fonctionnelles ont révélé que les miARNs participent à la régulation de presque tous les processus cellulaires connus tels le cycle cellulaire, le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire, la défense contre les virus et l'oncogenèse (Donker *et al.*, 2007 ; Hakim *et al.*, 2008 ; Krol, Loedige et Filipowicz, 2010 ; Wang *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2005). Par exemple, chez les cellules souches embryonnaires (ESC) humaines, les miARNs sont essentiels au bon fonctionnement à la fois de la voie de prolifération et de différenciation cellulaire. Les miARNs ESCC (*Embryonic Stem Cell-Cell Cycle*) partagent une séquence similaire et comprennent les membres des *clusters* miR-290 et miR-302. Ils stimulent la prolifération cellulaire et antagonisent la différenciation. Au contraire, les membres de la famille de miARNs let-7 opposent l'action des miARNs ESCC en inhibant plusieurs gènes indirectement activés par ces miARNs et stimulent la différenciation cellulaire (Martinez et Gregory, 2010).

1.4.1 Organisation génomique et biosynthèse des miARNs

1.4.1.1 Organisation génomique des gènes des miARNs

Les gènes des miARNs sont dispersés à travers le génome, à l'exception du chromosome Y (Bandiera *et al.*, 2010). Tel qu'illustré à la figure 1.4, ils sont introniques (Pheasant et Mattick, 2007) ou exoniques (Cai, Hagedorn et Cullen, 2004) et peuvent être situés dans des régions non codantes entre des gènes annotés ou dans des régions codantes. Les miARNs intergéniques sont transcrits à partir de leur propre promoteur. Plusieurs d'entre eux sont localisés en *clusters* ou grappes et génèrent de longs transcrits polycistroniques. Dans les faits, au moins le tiers des gènes des miARNs sont organisés en grappes chez l'humain. Le haut degré de conservation de ces grappes de miARNs à travers

les espèces suggère l'existence d'une pression évolutive incitant au maintien de cette organisation génique (Concepcion, Bonetti et Ventura, 2012). Enfin, les miARNs introniques retrouvés chez des gènes codants sont habituellement exprimés avec leur gène hôte et leur expression est par le fait même régulée par les mêmes facteurs que celui-ci (Friedman et Jones, 2009).

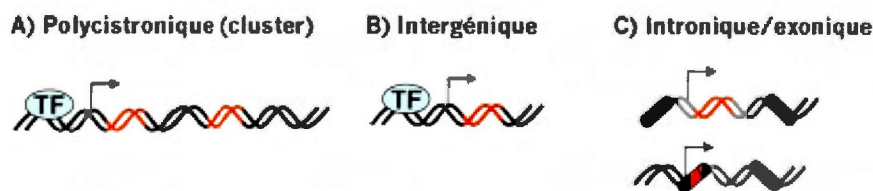


Figure 1.4 Organisation génomique des gènes de miARNs.

La séquence codant pour un miARN est représentée en rouge. TF : facteur de transcription. Les gènes de miARNs peuvent être localisés en A) *clusters* ou grappes de miARNs qui sont transcrits en de longs ARN polycistroniques qui seront par la suite clivés en de multiples miARNs. B) Les gènes des miARNs intergéniques sont des unités transcriptionnelles indépendantes. C) Certains gènes de miARNs sont situés dans les introns (en gris) de gènes codants ou dans les séquences exoniques (cylindres noirs) de gènes non-codants (Fazi et Nervi, 2008).

1.4.1.2 Voie canonique de biosynthèse des miARNs

La voie canonique de biosynthèse des miARNs est illustrée à la figure 1.5. Les gènes de miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II pour générer un transcrit primaire ou pri-miARN contenant une structure tige-boucle et de longueur pouvant aller de centaines de nucléotides à des dizaines de kilobases (kb). Comme les ARNm, les pri-miARNs transcrits par l'ARN polymérase II sont coiffés, polyadénylés et peuvent être épissés (Bushati et Cohen, 2007 ; Cai, Hagedorn et Cullen, 2004). Le pri-miARN est par la suite remanié par un complexe protéique nommé Microprocesseur composé de la ribonucléase de type III Drosha et de son cofacteur, la protéine liant l'ARN bicaténaire DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (Kim, 2005). Ce complexe clive la tige du pri-miARN en mesurant la distance

entre la jonction ARN simple brin/ARN double brin. Ce clivage résulte en un miARN précurseur (pré-miARN) en épingle à cheveux d'environ 70 nt. Caractéristique d'un clivage par une ribonucléase de type III, l'extrémité effrangée en 3' générée est reconnue par la protéine Exportine-5 qui transporte alors le pré-miARN dans le cytoplasme via un mécanisme Ran-GTP-dépendant (Wang *et al.*, 2007).

Une fois dans le cytoplasme, la boucle terminale de la tige du pré-miARN est clivée pour créer un duplexe de miARNs matures d'approximativement 22 nt. Ce clivage est accompli par Dicer, une autre ribonucléase de type III, qui interagit avec les protéines TRBP (*Trans-activation-responsive RNA-Binding Protein*) ou Loquacious et PACT (*Interferon-Inducible Double Stranded RNA Dependent Activator*) (Bushati et Cohen, 2007). TRBP recrute ensuite la protéine Argonaute 2 (Ago2) et ils forment alors avec Dicer un complexe trimérique qui amorce l'assemblage du complexe ribonucléoprotéique RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) (Chendrimada *et al.*, 2005). Un brin du duplexe de miARNs est incorporé dans le complexe RISC alors que l'autre brin est généralement dégradé. Des études sur les duplexes de siARN indiquent qu'il s'agit de la stabilité thermodynamique relative aux extrémités du duplex qui détermine quel brin sera sélectionné : le brin où l'appariement des bases est relativement instable à l'extrémité 5' est préférentiellement incorporé dans le complexe RISC (Kim, 2005).

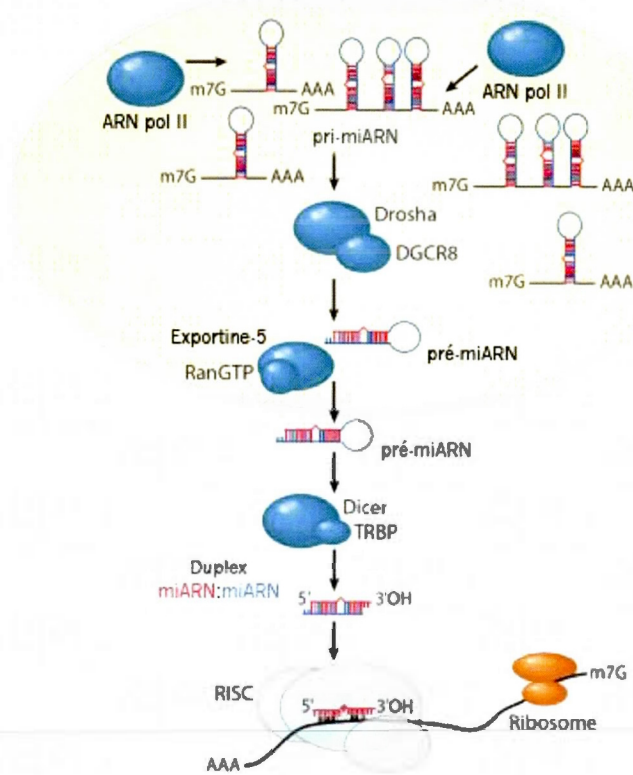


Figure 1.5 Voie de biosynthèse canonique des miARNs.

Les gènes des miARNs sont transcrits par l'ARNpol II puis les transcrits primaires (pri-miARN) sont clivés par le complexe Microprocesseur. Les pré-miARNs sont alors exportés vers le cytoplasme via la protéine Exportine-5. Dans le cytoplasme, les pré-miARNs sont clivés par Dicer et l'un des brins du duplexe miARN:miARN généré est ensuite inséré dans le complexe RISC. Image tirée de Skalsky et Cullen (2010).

1.4.2 Fonctions et mécanismes d'action des miARNs

1.4.2.1 Mécanisme d'action des miARNs

Une fois incorporé dans le complexe RISC, le miARN guide le complexe vers ses ARN cibles. Les miARNs exercent leur fonction en se liant via l'appariement de bases à la séquence complémentaire dans la région 3'-UTR des ARNm (Bartel, 2009). Dans le cas d'une complémentarité parfaite ou presque parfaite du miARN avec sa cible, l'ARNm est clivé par l'activité endonucléase de Ago2 puis dégradé. Chez les Animaux, les miARNs s'apparient pour la plupart de manière imparfaite avec leur cible, ce qui provoque plutôt une inhibition de la traduction (Bushati et Cohen, 2007). Il n'existe toujours pas à ce jour de consensus quant à la manière par laquelle cette inhibition est accomplie. Les mécanismes proposés sont l'encombrement stérique, la déadénylation, la dégradation et la séquestration des ARNm (Nilsen, 2007). La diversité des mécanismes existants et leur diversité serait la conséquence d'interactions protéine-protéine et ARN-protéine spécifiques (Figure 1.6) (Tang *et al.*, 2008 ; Chekulaeva et Filipowicz, 2009). Par contre, des expériences menées par l'équipe du Dr. David P. Bartel ont permis de démontrer que les miARNs agiraient principalement en déstabilisant l'ARNm ciblé : la simple interaction miARN:ARNm déstabiliserait le transcrit et aurait pour conséquence d'inhiber la synthèse protéique (Baek *et al.*, 2008 ; Guo *et al.*, 2010). Enfin, des analyses bioinformatiques et des données tirées d'expériences récentes suggèrent qu'une portion remarquable des gènes est régulée par les miARNs. Certains auteurs affirment que jusqu'à 50% des gènes codants seraient régulés par les miARNs.

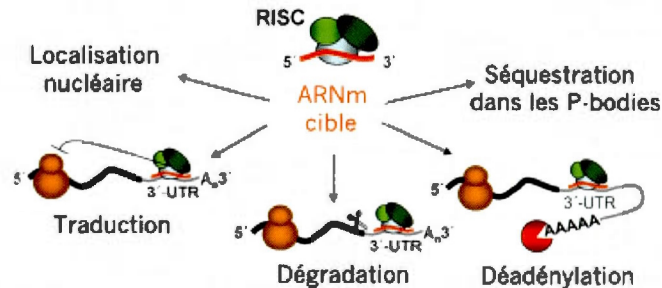


Figure 1.6 Mécanismes d'action des miARNs.

Les miARNs exercent leur action sur les ARNm cible via l'appariement de bases. La liaison d'un miARN à sa cible peut résulter en l'inhibition de la traduction, la dégradation/clivage, la déadénylation, le transport au noyau ou la séquestration dans les *P-bodies* (compartiment cellulaire) de l'ARNm ciblé. Image tirée de Fazi *et al.* (2008).

1.4.2.2 Fonctions des miARNs

L'étude de la régulation de l'expression génique par les miARNs a mené les chercheurs à constater l'existence de plusieurs paradoxes. Tout d'abord, les algorithmes de prédiction utilisés dans ce domaine de recherche identifient généralement des dizaines ou centaines de cibles pour chaque miARN. Pourtant, des études génétiques dans quelques systèmes *in vivo* bien connus démontrent que l'inhibition de seulement quelques cibles a un rôle physiologique. En second lieu, l'importance de l'inhibition de l'expression génique par les miARNs est étonnamment modeste et dépasse rarement un ordre de 2. Il est donc très probable que dans bien des cas l'inhibition de l'expression génique par les miARNs n'a pas de conséquences au niveau physiologique puisque leur effet inhibiteur est tamponné par des mécanismes homéostatiques. Seitz (2009) a donc posé l'hypothèse que la conservation de ce nombre élevé de sites de liaison pour chaque miARN est due au fait qu'une grande proportion de ceux-ci agit à titre d'inhibiteur compétitif pour le miARN en question. Conséquemment, seulement les gènes dont l'activité est sensible à une modeste réduction de l'expression protéique seraient des cibles authentiques. En résumé, l'activité de chaque miARN est régulée par ses « cibles » et non l'inverse. Pour chaque type cellulaire, la composition du transcriptome régulerait donc l'activité d'un miARN. Un tel système permettrait que la régulation des cibles d'un miARN intègre l'expression de centaines d'autres gènes (Seitz, 2009). Cette hypothèse semble être appuyée par des travaux qui ont

en effet démontré que la concentration absolue d'un miARN est déterminante pour l'interaction miARN-ARNm (Li *et al.*, 2010 ; Ragan, Zuker et Ragan, 2011 ; Ripoli *et al.*, 2010). Il a également été découvert que les miARNs n'inhibent pas davantage l'expression des ARNm faiblement exprimés que celle des ARNm plus fortement exprimés (Guo *et al.*, 2010). Cette hypothèse permettrait donc d'expliquer les apparentes contradictions observées dans la littérature entre les cibles confirmées pour un même miARN dans différents tissus.

1.4.3 Régulation de l'expression des miARNs

La transcription des gènes des miARNs est régulée de manière semblable à celle des gènes codant pour une protéine. Les régions du promoteur des gènes des miARNs autonomes sont hautement semblables aux promoteurs des gènes codants. La présence d'îlots CpG, de séquences TATA *box*, d'éléments d'initiation de la transcription et de certaines modifications des histones démontre que les promoteurs des gènes des miARNs sont également sous le contrôle de facteurs de transcription, d'*enhancers*, de *silencers*, et de modifications de la chromatine (Krol, Loedige et Filipowicz, 2010). Aussi, de nombreuses études ont rapporté que plusieurs miARNs régulent leur propre transcription au moyen d'une boucle de rétro-activation ou de rétro-inhibition avec des facteurs de transcription spécifiques (Herranz et Cohen, 2010). Les miARNs sont particulièrement bien adaptés pour participer à ces boucles de rétro-action en raison de leur capacité à s'apparier et inhiber les ARNm codant pour des facteurs impliqués dans leur fonction ou leur biosynthèse (Bartel, 2009 ; Ivey et Srivastava, 2010).

La régulation des facteurs impliqués dans la maturation des miARNs a émergé comme un autre mécanisme important de la régulation spatio-temporelle des miARNs. L'expression et l'activité des enzymes Drosha et Dicer ainsi que leur partenaire liant l'ARN double brin sont sujets à une régulation qui affecte l'accumulation des miARNs. Par exemple, DGCR8 a un effet stabilisant sur Drosha par son interaction alors que Drosha contrôle les niveaux de DGCR8 en clivant les motifs épingle à cheveux présents dans l'ARNm de DGCR8, induisant sa dégradation (Davis-Dusenbery et Hata, 2010). Des études récentes ont identifié une pléiade de protéines (LIN-28, les hélicases p68 (DDX5) et p72 (DDX17), les protéines SMAD et son partenaire SNIP1, etc.) qui régulent positivement ou négativement la maturation des miARNs en interagissant avec Drosha, Dicer ou en se liant aux précurseurs des miARNs (Newman et Hammond, 2010). Malgré que l'activité de certains de ces régulateurs soit

restreinte à une seule famille de miARNs, la plupart affectent la maturation d'un large éventail de précurseurs, suggérant que leur activité peut affecter des réseaux de gènes entiers (Davis-Dusenbery et Hata, 2010). Plusieurs pri-miARN et pré-miARN sont également ciblés par les enzymes ADAR qui modifient leur séquence par la déamination de l'adénosine en inosine. Cela peut perturber leur clivage par Drosha, Dicer ou encore leur transport vers le cytoplasme (Krol, Loedige et Filipowicz, 2010). L'édition de la séquence d'un miARN peut aussi avoir un impact important sur la spécificité de ces miARNs : les modifications peuvent par exemple augmenter le nombre d'ARNm ciblés par un miARN (Guo *et al.*, 2012 ; Krol, Loedige et Filipowicz, 2010 ; Lee *et al.*, 2010). L'activité des miARNs est également étroitement régulée en aval de leur synthèse. Des ribonucléoprotéines telles que RBM4, HuR, FMRP ou DND1 se lient notamment au même ARNm que le complexe RISC et interagissent avec les composants de celui-ci, atténuant ou stimulant l'effet des miARNs (Krol, Loedige et Filipowicz, 2010). A cet effet, il a été démontré que l'expression des protéines Argonaute influence grandement l'expression des miARNs matures. En plus de stabiliser les miARNs, la disponibilité de Ago2 est un facteur limitant l'activité des miARNs (Kai et Pasquinelli, 2010).

Enfin, les miARNs présentent un grand intérêt biotechnologique pour les chercheurs puisqu'ils constituent entre autres d'excellents biomarqueurs. Ils sont tout d'abord très abondants dans les fluides corporels et peuvent donc être échantillonnés aisément de manière non invasive. Ils sont également remarquablement stables et peuvent être conservés durant de longues périodes. Néanmoins, leur commodité vient du fait que leurs patrons d'expression est hautement caractéristique (Gilad *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2005). En effet, malgré que bien des miARNs soient exprimés de manière ubiquitaire, plusieurs d'entre eux démontrent des patrons d'expression bien spécifiques à un stade du développement, à un organe ou à un type cellulaire (Newman et Hammond, 2010). Par conséquent, un nombre important d'études a catalogué l'expression des miARNs afin de découvrir leurs fonctions (Wang *et al.*, 2007).

1.5 MiARNs placenta-spécifiques

Les miARNs sont abondamment exprimés dans le placenta. D'ailleurs, un nombre important est exprimé uniquement dans cet organe (Liang *et al.*, 2007). Parmi ceux-ci, on retrouve les miARNs dérivés de la grappe de miARNs présente sur le chromosome 19 (C19MC), située en position 19q13.41 (Tsai *et al.*, 2009). Spécifique aux primates, cette grappe de gènes est le plus important *cluster* de miARNs connu. Il comprend environ 8% de tous les gènes de miARNs humains, soit 46 gènes dont 41 ont été clonés à ce jour. C19MC est un gène à empreinte, exclusivement exprimé dans le placenta et les tissus embryonnaires à partir de l'allèle paternelle (Noguer-Dance *et al.*, 2010). Les gènes du C19MC sont divisés en 2 sous-familles basées sur l'homologie de leur séquence (Donker *et al.*, 2012). Il a été découvert que l'expression des miARNs de la grappe C19MC augmente dans les trophoblastes au cours de la grossesse (Morales-Prieto *et al.*, 2012). Cependant, le rôle du C19MC est toujours inconnu à ce jour. Comme les membres de cette grappe constituent la majorité des miARNs identifiés dans le sang maternel lors de la grossesse, ils pourraient jouer un rôle important dans la communication mère-placenta (Donker *et al.*, 2012). Il a également été rapporté que l'expression ectopique de certains membres de la grappe C19MC (miR-520g et miR-517c) stimulent la prolifération et le renouvellement cellulaire. Une expression aberrante des miARNs du C19MC a d'ailleurs été observée dans plusieurs cancers agressifs (Mouillet, Chu et Sadovsky, 2011).

Par ailleurs, les cellules placentaires expriment également les miARNs des grappes C14MC et miR-371-3. La grappe C14MC s'étend sur le domaine 14q32 et comprend 34 miARNs. Ce *cluster* de miARNs serait conservé chez toutes les espèces eutheriennes et, contrairement à C19MC, est exprimé uniquement à partir de l'allèle maternelle. De plus, l'expression de C14MC diminue au cours de la grossesse. Les gènes à empreinte sont connus pour jouer un rôle important dans la régulation du destin et de la différenciation cellulaire. Enfin, les miARNs membres de la grappe miR-371-3 également exprimés dans les cellules placentaires sont spécifiques aux cellules embryonnaires humaines et seraient impliqués dans le maintien des cellules souches et la différenciation cellulaire (Morales-Prieto *et al.*, 2012). En terminant, Morales-Prieto *et al.* (2012) ont rapporté que les grappes C19MC et miR-371-3 ne sont pas exprimés dans les cellules de la lignée HTR-8/SVneo dérivées de trophoblastes du premier trimestre immortalisés alors que les miARNs de la grappe C14MC ne sont pas exprimés dans les choriocarcinomes de la lignée JEG-3.

1.5.1 Fonctions des miARNs placentaires

1.5.1.1 Implication des protéines responsables de la biosynthèse et de la maturation des miARNs placentaires dans la grossesse

Les protéines essentielles à la biosynthèse des miARNs (Drosha, Exportine-5, Dicer et Ago2) sont exprimées et fonctionnelles dans les trophoblastes humains (Donker *et al.*, 2007). L'expression de Dicer diminue vers le terme de la grossesse. Cette diminution est accompagnée d'une réduction de 79,5 % de l'expression des miARNs exprimés avant terme, suggérant que les miARNs ont un rôle à jouer dans la grossesse et la parturition (Montenegro *et al.*, 2009).

1.5.1.2 Implication des miARNs circulants dans la grossesse

L'expression de nombreux miARNs a été détectée dans la circulation maternelle (Chim *et al.*, 2008 ; Kotlabova, Doucha et Hromadnikova, 2011 ; Miura *et al.*, 2010). Ceux-ci y sont présents à l'intérieur d'exosomes (Luo *et al.*, 2009) ou encore associés à des protéines liant l'ARN comme NPM1 (*Nucleophosmin 1*) (Wang *et al.*, 2010). La plupart sont membres de la grappe de miARNs C19MC et leur expression a été trouvée comme étant plus élevée lors du troisième trimestre de grossesse (Luo *et al.*, 2009 ; Miura *et al.*, 2010). Cela pourrait être attribué au fait qu'une plus grande quantité de matériel trophoblastique est libérée dans la circulation maternelle par le placenta durant le dernier trimestre de la grossesse (Askelund et Chamley, 2011 ; Askelund, Chamley et Pantham, 2011). D'autre part, cela pourrait simplement être une conséquence de la croissance rapide du placenta durant ce trimestre afin de rencontrer les besoins croissants du fœtus en développement (Luo *et al.*, 2009). L'importance biologique de la présence de miARNs d'origine placentaire dans la circulation maternelle reste encore à déterminer, mais une possibilité intéressante est que ces petites molécules pourraient moduler l'expression des gènes maternels (Chim *et al.*, 2008). Également, un grand effort a été déployé par les chercheurs afin d'étudier les miARNs circulants dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs. À ce sujet, de nombreux auteurs ont tenté d'utiliser les miARNs présents dans le sérum maternel comme biomarqueurs pour la détection précoce de la grossesse (Gilad *et al.*, 2008 ; Kotlabova, Doucha et Hromadnikova, 2011 ; Miura *et al.*, 2010), de la PE (Hromadnikova *et al.*, 2012) ou encore de cardiopathies congénitales (Yu *et al.*, 2011).

1.5.1.3 Implication des miARNs dans l'implantation et le développement précoce du placenta

La cytokine LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) est essentielle à l'implantation du blastocyste (Fitzgerald *et al.*, 2008). Une équipe de chercheurs a récemment démontré que la stimulation de cellules de la lignée JEG-3 par LIF provoquait une augmentation de l'expression de miR-21 et miR-93 ainsi qu'une diminution de plus de 50% de l'expression de miR-141. L'inhibition totale de l'expression de miR-141 a par ailleurs eu pour conséquence d'inhiber complètement la prolifération cellulaire, suggérant que LIF régule l'expression de certains miARNs pouvant être responsables de plusieurs effets fonctionnels induits par LIF comme la migration et l'invasion (Morales-Prieto, Schleussner et Markert, 2011). De plus, il a été rapporté que miR-378a-5p stimule la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire dans les cellules de la lignée HTR8/Sneo dérivées de cellules de l'ectoderme du blastocyste en ciblant la protéine Nodal. Nodal est un membre de la superfamille TGF- β connu pour jouer un rôle essentiel durant le développement embryonnaire précoce. Dans le placenta, la liaison de cette protéine à son récepteur ALK7 (*Activin Receptor Like Kinase 7*) inhibe la migration et l'invasion des trophoblastes en plus d'induire l'apoptose. Fait intéressant, il a été constaté que miR-378a-5p est plus fortement exprimé durant le premier et deuxième trimestre de la grossesse (Luo *et al.*, 2012).

1.5.1.4 Hypoxie et miARNs

Le placenta se développe dans un environnement hypoxique durant le premier trimestre de la grossesse (James, Stone et Chamley, 2006). Des variations dans la concentration d'oxygène enclenche plusieurs processus de différenciation dans le placenta, incluant l'érythropoïèse et l'angiogenèse (Myatt et Cui, 2004). La littérature fait état de neuf miARNs (miR-93, -205, -210, -224, -335, -424, -451, -491, -518c) dont l'activité est modulée par l'hypoxie. Tous sont modulés à la hausse à l'exception de miR-424 (Tableau 1.1) (Morales Prieto et Markert, 2011). MiR-424 est un miARN spécifique aux mammifères qui jouerait un rôle important dans la différenciation de la lignée monocyte-macrophage. Ce miARN est fortement exprimé dans le placenta, mais son rôle dans la physiologie placentaire reste toujours à déterminer. Il a été confirmé que miR-205 inhibe l'expression de MED1 (*Mediator of RNA Polymerase II Transcription Subunit 1*), un régulateur bien connu du

développement placentaire. Il a par ailleurs été suggéré que ce miARN épithélium-spécifique participe à l'adaptation du placenta à un environnement hypoxique (Mouillet *et al.*, 2010). Enfin, l'hypoxie induit l'expression de miR-210. Il a été rapporté que ce miARN est exprimé surtout dans le ST et qu'il cible le transcrite de l'enzyme HSD17 β 1 (*Hydroxysteroid (17- β) Dehydrogenase 1*) responsable de la conversion d'estrone en 17 β -estradiol. Par contre, il a également été avancé que le facteur de transcription HIF1A (*Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha*) pourrait être la cible de miR-210 (Ishibashi *et al.*, 2012). Enfin, ce miARN a été rapporté par plusieurs comme étant exprimé à la hausse dans les placentas de grossesses compliquées par la PE. En conclusion, la tension en oxygène semble réguler l'expression d'un nombre important de miARNs.

Tableau 1.1 MiARNs dont l'expression est modulée par l'hypoxie.

miARN		Expression	Cibles	Référence(s)
miR-93	↑	CT vilieux	VEGF*	Donker <i>et al.</i> , 2007 Mouillet, Chu et Sadovsky, 2010
miR-424	↓	CT vilieux	FGFR1, MAP2K1	Donker <i>et al.</i> , 2007 Morales-Prieto et Markert, 2011
miR-210	↑	Trophoblastes vilieux BeWo, JEG-3	HSD17 β 1, HIF1A*	Ishibashi <i>et al.</i> , 2012 Mouillet <i>et al.</i> , 2011
miR-518c	↑	Trophoblastes vilieux BeWo, JEG-3	HSD17 β 1	Ishibashi <i>et al.</i> , 2012
miR-205	↑	CT vilieux	MED1	Mouillet <i>et al.</i> , 2010

* Cible putative

1.5.1.5 Implication des miARNs dans la tolérance fœto-maternelle

Il a récemment été découvert que miR-148 et miR-152 régulent l'expression de la molécule HLA-G du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Son inhibition par ces deux miARNs a eu pour conséquence une augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK qui, tôt dans la grossesse, constituent la principale population de lymphocytes présents à l'interface materno-fœtale (Manaster *et al.*, 2012). Une faible expression de HLA-G est associée avec des complications de grossesse comme la PE (Colbern, Chiang et Main,

1994). En effet, le patron d'expression particulier de HLA-G semble indiquer que cette molécule procure une protection immune au fœtus semiallogénique (Benirschke, Burton et Baergen, 2012c ; Warning, McCracken et Morris, 2011). Une expression plus élevée de miR-152 dans les placentas obtenus de grossesses compliquées par la PE a d'ailleurs été mesurée (Manaster *et al.*, 2012).

1.5.1.6 MiARNs et la prééclampsie

L'expression de plusieurs miARNs est altérée dans les placentas de grossesses compliquées par la PE (Enquobahrie *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2009 ; Mayor-Lynn *et al.*, 2010 ; Pineles *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2009). Des études fonctionnelles récentes ont révélé quelques-uns des mécanismes moléculaires par lesquels les miARNs participent au développement de la PE (Tableau 1.2). À cet effet, la surexpression de miR-155 dans les placentas de grossesses compliquées par la PE contribuerait au développement de cette pathologie en inhibant l'expression du facteur CYR61 (*Cysteine-Rich Angiogenic Inducer 61*) également nommé CCN1 (*CCN Family Member 1*). Il a été démontré que CYR61 est l'un des facteurs angiogéniques précoces importants durant la grossesse : la délétion de ce gène chez la souris résulte en la mort des embryons en raison d'une insuffisance vasculaire placentaire. Cette protéine stimule en effet la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) par les cellules trophoblastiques, ce qui induit la migration des cellules endothéliales (Zhang *et al.*, 2010). De plus, Wang *et al.* (2012) ont récemment rapporté que les gènes EFNB2, MMP2, VEGFA et HIF1A sont la cible de miR-20b dans les cellules des lignées trophoblastiques BeWo et HUVEC. L'ensemble de ces gènes contribue significativement au développement précoce du placenta, notamment en régulant la réponse angiogénique (Wang *et al.*, 2012). En conclusion, les résultats obtenus par plusieurs études semblent indiquer que les miARNs contribuent au développement de la PE en inhibant l'expression de gènes clés dans l'angiogenèse (Enquobahrie *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2010).

Tableau 1.2 MiARNs dont l'expression est plus élevée dans les placentas de grossesses compliquées par la prééclampsie.

miARN	Expression	Cibles	Référence(s)
miR-210	↑ Trophoblastes villos	HSD17β1	Pineles <i>et al.</i> , 2007 Zhu <i>et al.</i> , 2009 Enquobahrie <i>et al.</i> , 2010 Ishibashi <i>et al.</i> , 2012
miR-518c	↑ Trophoblastes villos	HSD17β1	Ishibashi <i>et al.</i> , 2012
miR-155	↑ Trophoblastes villos	CYR61	Pineles <i>et al.</i> , 2007 Zhang <i>et al.</i> , 2012

1.5.1.7 MiARNs et le retard de croissance intra-utérin (RCIU)

Maccani, Padbury et Marsit (2011) ont rapporté que l'expression de miR-16 et miR-21 était significativement réduite chez les nourrissons avec un petit poids à la naissance. Ils ont également observé qu'une faible expression de miR-16 dans le placenta pouvait aller jusqu'à quadrupler la probabilité que le nourrisson naisse avec un petit poids. De plus, une plus grande probabilité de développer un RCIU a été suggéré pour les placentas où l'expression à la fois de miR-16 et de miR-21 est faible (Maccani, Padbury et Marsit, 2011). D'ailleurs, cette étude faisait suite à une étude publiée un peu plus tôt qui rapportait que l'expression de miR-16, miR-21 et miR-146 était significativement plus basse dans les placentas de mères fumeuses. Il a été démontré que de fumer durant la grossesse est associé avec une augmentation des risques d'avortement spontané et d'accouchement prématuré ainsi que de développer un RCIU en raison d'une diminution des fonctions placentaires (Maccani *et al.*, 2010).

1.6 Hypothèses de travail

Des études ayant utilisé une approche reposant sur l'inhibition globale de la synthèse *de novo* des miARNs ont constaté l'accumulation des cellules mammaires humaines en G1 (Bu *et al.*, 2009) et l'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules endothéliales humaines (Suarez *et al.*, 2007). Dans les trophoblastes humains primaires, l'expression de certains miARNs membres du C19MC diminue suite à leur différenciation en culture (Donker *et al.*, 2012). Cela suggère un rôle des miARNs dans la différenciation, mais surtout dans le maintien de la pluripotence cellulaire (Mouillet, Chu et Sadovsky, 2011). L'expression de plusieurs miARNs (miR-20a, -20b, -21, -32, -455, et -513) est également altérée suite à la différenciation des cellules de la lignée de choriocarcinomes BeWo *in vitro* (Lash *et al.*, 2010). Notre hypothèse est donc que les miARNs sont des régulateurs négatifs de la différenciation des cellules de la lignée trophoblastique.

Afin de vérifier notre hypothèse, une approche fonctionnelle reposant sur l'inhibition de l'enzyme nucléaire Drosha par la technologie de l'ARNi a été adoptée pour cette étude. Afin d'obtenir une inhibition optimale de l'expression de Drosha, la transfection de petits ARNs interférants a tout d'abord été mise au point dans la lignée de choriocarcinomes BeWo. Ainsi, la réduction globale de l'expression des miARNs résultant de l'inhibition de l'expression de Drosha a permis d'étudier leur rôle dans la différenciation tant morphologique que biochimique des trophoblastes *in vitro*. Pour ce faire, la formation de syncytia ainsi que la sécrétion de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) par les cellules BeWo en culture ont respectivement été mesurées. Afin d'apporter des pistes de recherche quant aux mécanismes moléculaires par lesquels les miARNs exercent leur action dans les cellules BeWo, l'expression des transcrits de plusieurs protéines participant au processus de fusion cellulaire a également été quantifiée. Enfin, des analyses bioinformatiques ont été réalisées afin d'identifier les miARNs qui pourraient être responsables de la régulation de l'expression du transcrit de une ou plusieurs de ces protéines.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE

2.1 Culture cellulaire

Les choriocarcinomes humains de la lignée BeWo (ATCC, cat. CCL-98) ont été utilisés pour cette étude. Les cellules de la lignée continue BeWo sont cultivées dans le milieu Ham's F12 (Wisent, cat. 318-010-CL) enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (PAA Laboratories Inc., cat. A15-211) dans une atmosphère humide à 37°C en présence de 5% de CO₂.

2.2 Interférence par ARN

Des cellules BeWo ont d'abord été mises en culture à une densité de 3×10^5 cellules/puits en plaques de 24 puits. Les cellules ont par la suite été transfectées avec un petit ARN interférant ciblant Drosha : siARN1 5'-AAGGGATTAACACCTTGATAA-3' (QIAGEN, cat. SI04271008) ou siARN2 5'-ACGAAGCTCGATGAAGATTTA-3' (QIAGEN, cat. SI00703997). Un siARN ne présentant pas d'homologie avec un gène de mammifère connu désigné siARNc 5'-CCTCCGCCCTAAGTCATTT-3' (QIAGEN) a été utilisé comme témoin négatif. Les cellules ont été transfectées à l'aide du réactif HiPerfect (QIAGEN, cat. 301705) selon les recommandations du fabricant. L'efficacité de transfection a été vérifiée à l'aide du siARN fluorescent BLOCK-iT Alexa Fluor Red (Invitrogen, cat. 14750-100). L'inhibition maximale de l'expression de Drosha a été mesurée 24h suivant la transfection des siARNs spécifiques. Par conséquent, 24h post-transfection, les cellules ont été traitées à la forskoline (50 µM) (Vargas *et al.*, 2008) (Sigma, cat. F6886) pour une période de 24h afin de les pousser à se différencier (Wice *et al.*, 1990).

2.3 Extraction des protéines cellulaires totales et immunobuvardage de type Western

Afin de quantifier l'expression de la protéine Drosha, les cellules traitées ou non à la forskoline ont été d'abord rincées 48h post-transfection avec du tampon phosphate salin (PBS) [10 mM phosphate de sodium (NaH_2PO_4) (pH 7.2) 0.9% chlorure de sodium (NaCl)] puis lysées dans du tampon de radioimmunoprécipitation (RIPA) froid [10 mM chlorhydrate de tris hydroxyméthyl-aminométhane (Tris-HCl) (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM acide éthylène dinitrilo-tétra-acétique (EDTA), 1mM acide (éthylène bis(oxyéthylènenitrolo))tétraacétique (EGTA), 1% Triton 100, 100 mM fluorure de sodium (NaF), 10 mM pyrophosphate de tétrasodium ($\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$), 2 mM orthovanadate de sodium (p/v)] supplémenté avec le cocktail inhibiteur de protéases Complete Mini EDTA free (Roche Diagnostics, cat. 11836170001)]. Les lysats protéiques ont été conservés sur glace pendant 30 min puis centrifugés à 14 000g pendant 10 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le contenu protéique des surnageants obtenus a été mesuré par spectrophotométrie (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad) en utilisant la méthode BCA (Pierce). 8 µg de protéines ont été diluées dans du tampon d'échantillon [4% SDS, 30 mM di-Dithio-1,4 thréitol (DTT), 0,25 M sucrose, 0,01 M EDTA disodique (EDTA-Na_2) et 0,075% bleu de bromophénol, 5% mercapto-2-éthanol] et chauffées à 95°C durant 5 min. Les protéines dénaturées ont ensuite été séparées sur un gel *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) 12% puis transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) Immobilon-P (Millipore, cat. IPVH00010). Le point isoélectrique de la protéine Drosha a été calculé à l'aide du logiciel CLC Main Workbench 6.7 (CLC Bio). Puisque celui-ci est de 8,3, le tampon de transfert Bjerrum et Schafer-Nielson (pH 9,2) [48 mM trométhamine (Tris), 39 mM glycine, 20% méthanol (MeOH), 0,5% laurylsulfate de sodium (SDS)] a été utilisé pour cette expérience. La membrane a été incubée durant 1h à température ambiante dans une solution de *Tris Buffered Saline-Tween* (TBS-T) [20 mM Tris (pH 7,6), 137 mM NaCl et 0,1% Tween-20] et *Bovine Serum Albumine* (BSA) 0,5% afin de bloquer les sites d'interactions non spécifiques. Par la suite, la membrane a été incubée toute la nuit à 4°C en présence d'un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre Drosha (1/250) (Cell Signaling Technology, cat. 3364). La membrane a ensuite été rincée trois fois pendant 10 min avec du TBS-T et incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) (1/5000). Un signal a été détecté en utilisant la solution Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, cat. WBKLS0500) et visualisé par autoradiographie (Denville Scientific Inc., cat. E3218). Des anticorps dirigés contre la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (1/5000) (Chemicon International, cat. MAB374) ou α -tubuline

(1/5000) (Sigma, cat. T9026) ont été utilisés afin de normaliser le contenu protéique (Lanoix *et al.*, 2012b). La densitométrie a été calculée à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad) afin de quantifier l'expression de la protéine Drosha.

2.4 Immunofluorescence

Des cellules de la lignée BeWo ont été mises en culture à une densité de 3×10^5 cellules/puits en plaques de 24 puits. Les cellules ont été transfectées par l'ajout de 37,5 ng de siARN ciblant Drosha complexé avec 3 μ l de HiPerfect dans chaque puits. Les transfections ont été effectuées en duplicata. 24h post-transfection, les cellules ont été différenciées par l'ajout de forskoline (50 μ M) au milieu de culture durant une période de 24h. 72h post-transfection, le surnageant de culture a été recueilli afin d'évaluer la différenciation biochimique des cellules en culture par le dosage de la β -hCG. Les cellules ont alors été rincées avec du PBS puis fixées avec du MeOH froid à -20°C pendant 45 min. Le MeOH a ensuite été rincé puis les cellules BeWo incubées durant 1h à température ambiante avec du PBS contenant 2% de FBS afin d'éliminer les liaisons non spécifiques. Afin de mettre en évidence la membrane plasmique aux jonctions cellulaires, les trophoblastes ont alors été incubés pendant 2h à température ambiante en présence d'un anticorps monoclonal (clone ZK-31) dirigé contre une protéine desmosomale (1/800) (Novus Biologicals, cat. NB120-11371) (Lang, Odermatt et Ruettnner, 1986) dans une solution de PBS contenant 0,5% de BSA. Par la suite, les puits ont été rincés avec du PBS puis les cellules ont été incubées dans le noir à température ambiante avec un anticorps anti-souris IgG couplé à la molécule Alexa Fluor 488 (1/1000) (Invitrogen, cat. A11001) pendant 1h30. Afin de visualiser les noyaux, les cellules trophoblastiques ont été incubées dans le noir avec de l'iodure de propidium (PI) (50 μ g/ml) (Sigma, cat. P4864) durant 15 min. Les puits ont été rincés avec du PBS et les cellules observées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser MRC1024 de BioRad à l'aide d'un objectif 20X. Les photos prises aléatoirement ont été traitées à l'aide du logiciel MBF Image J (McMaster Biophotonics Facility, Université McMaster, Département des sciences de la santé). Afin de quantifier la différenciation morphologique des trophoblastes, l'index de fusion cellulaire a été calculé. Il est exprimé comme le pourcentage de noyaux présents dans un syncytium. Pour ce faire, le nombre de noyaux présents dans un syncytium a été dénombré dans 4 champs microscopiques par puits. Par la suite, ce nombre a été rapporté sur le nombre total de noyaux présents dans les champs

microscopiques échantillonnés. En général, plus de 200 noyaux étaient présents par champ et environ 2000 noyaux ont été dénombrés par traitement.

2.5 Dosage de la production de β -hCG

Les surnageants de culture des cellules BeWo recueillis 72h post-transfection ont été centrifugés à 14 000g pendant 10 min à 4°C, aliquotés puis conservés à -20°C jusqu'au moment du dosage. La sécrétion de β -hCG par les trophoblastes a été dosée à l'aide d'une trousse ELISA (DRG Diagnostics, cat. EIA-1911) selon les recommandations du fabricant. Pour ce faire, les surnageants de culture ont d'abord été dilués à l'aide de la solution de dilution (*Sample Diluant*). Les surnageants des cellules traitées à la forskoline ont été dilués 1/50 alors que le surnageant des cellules non différenciées ont été dilués 1/5. Suite à l'arrêt de la réaction enzymatique, la densité optique a immédiatement été mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. À l'aide des données de la courbe-étalon, la concentration de β -hCG dans chacun des échantillons a été calculée. Les valeurs obtenues ont été rapportés sur la quantité de protéines contenues dans le surnageant de culture testé. Les protéines ont été dosées par la méthode BCA selon les recommandations du fabricant.

2.6 Extraction des ARNs totaux, transcription inverse (RT) et réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR)

Les ARNs totaux ont été isolés 48h post-transfection à l'aide de la trousse *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics, cat. 11828665001) selon les recommandations du fabricant. 500 ng d'ARNs totaux ont été rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) avec la transcriptase inverse MMLV (Sigma, cat. M1302) et des amorces oligo (dT)₁₅ (Roche Diagnostics, cat. 10814270001) selon les recommandations du fabricant dans un tampon de réaction ne contenant pas de DTT (Sigma, cat. P2192). Les réactions de qRT-PCR ont été effectuées à l'aide d'un appareil Light Cycler 480 (LC480) (Roche Diagnostics). Chacune des réactions a été exécutée dans un volume final de 10 μ l avec 1 μ l d'ADNc, 0,5 μ M des amorces sens et antisens (Tableau 2.1) ainsi que du *SYBR Green I Master 1X* (Roche Diagnostics, cat. 04707516001) selon les recommandations du fabricant. Les amorces employées ont été conçues à l'aide du logiciel Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Afin d'éviter l'amplification de fragments d'ADN

génomique, les paires d'amorces utilisées pour cette étude ont été conçues lorsque possible afin d'amplifier un fragment chevauchant 2 exons. Les paramètres d'amplification pour tous les gènes étudiés étaient de 50 cycles à 95°C durant 15s, 60°C durant 20s et 72°C durant 20s. Des analyses de courbe de fusion (65-95°C) (*Melting Curve*) ont été réalisées à la fin de toutes les réactions de qPCR afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Chaque ronde de PCR incluait un témoin négatif ne contenant pas d'ADNc et chaque échantillon a été analysé en duplicata. Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel LightCycler®480 version 1.5 (Roche Diagnostics). Une courbe étalon (cinq dilutions en série) a été utilisée afin d'extrapoler la concentration du transcrit des gènes étudiés dans les différents échantillons. L'expression du transcrit de chacun des gènes a été rapportée sur les gènes de référence GAPDH (Cleal *et al.*, 2009) et hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (HPRT1) (Lanoix *et al.*, 2012a). La moyenne géométrique des ratios obtenus a été calculée afin d'obtenir des valeurs normalisées plus précises (Murthi *et al.*, 2008).

Tableau 2.1 Amorces utilisées pour l'amplification des gènes à l'étude.

Gène	Accession	Amplicon (pb)		Amorce (5'—3')
Drosha	NM_013235.4	146	S	ACG AAC GGA GCA GAG AGC GAG AA
			AS	GCA TCC AGC AGG TTC AGG AAC AAC C
GAPDH	NM_002046.4	450	S	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
			AS	TCC ACC ACC CTG TTG CT
GJA1	NM_000165.3	159	S	GCA GGC GGG AAG CAC CAT CT
			AS	CTG CTG CTG GCA CGA CTG CT
GCM1	NM_003643.3	121	S	TCC TGC CTG GGT GTG GTG GT
			AS	TGG GAC AGC GTT TCC GCT GC
HPRT1	NM_000194.2	167	S	GAC CAG TCA ACA GGG GAC ATA A
			AS	AAG CTT GCG ACC TTG ACC
MFSD2A	NM_001136493.1	165	S	CCA TCA TGC TCT CGG CCA CTT TAA
			AS	CCA CAG CTA CCG CAT ATG TAA TG
Syncytine-1	NM_014590.3	83	S	GAA GGC CCT TCA TAA CCA ATG A
			AS	GAT ATT TGG CTA AGG AGG TGA TGT C
Syncytine-2	NM_207582.2	137	S	CCT TCA CTA GCA GCC TAC CG
			AS	GCT GTC CCT GGT GTT TCA GT
TJP1	NM_003257.3	132	S	GTG GTT CTT CGA GAA GCT GG
			AS	AGC GTC TCG TGG TTC ACT CT

S : amorce sens

AS : amorce antisens

2.7 Analyses bioinformatiques

Des analyses bioinformatiques ont été réalisées sur le segment 3'-UTR du transcrit de Syncytine-2 à l'aide des logiciels TargetScan (<http://targetscan.org>) (Garcia *et al.*, 2011 ; Friedman *et al.*, 2009 ; Grimson *et al.*, 2007 ; Lewis, Burge et Bartel, 2005) et miRanda (<http://www.microrna.org>) (Betel *et al.*, 2010 ; Betel *et al.*, 2008 ; John *et al.*, 2004 ; Landgraf *et al.*, 2007 ; John *et al.*, 2004 ; Enright *et al.*, 2003) afin de déterminer quels miARNs pourraient cibler ce transcrit. Afin d'y parvenir, ces algorithmes utilisent plusieurs critères tels que le degré de complémentarité de la séquence *seed* du miARN au site cible présumé, l'énergie libre (ΔG) du complexe miARN-ARNm formé et le degré de conservation du site. Pour cette étude, seuls les miARNs ciblant des sites conservés ont été retenus puisqu'il a été démontré qu'il s'agit d'une méthode permettant de réduire le nombre de faux positifs (Friedman *et al.*, 2009 ; Thomas, Lieberman et Lal, 2010). Suite à l'analyse du segment 3'-UTR du transcrit de Syncytine-2 à l'aide des algorithmes TargetScan et MiRanda, les miARNs prédits par chacun des algorithmes ont été mis en évidence. Chacun de ceux-ci ont été caractérisés et leurs séquences alignées à l'aide du logiciel CLC Main Workbench 6.7 (CLC Bio).

2.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées au cours de cette étude sont des analyses de la variance à un facteur (ANOVA *One-Way*) suivi d'un test de Tukey-Krammer. Elles ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Les données utilisées au cours de cette étude proviennent de trois passages cellulaires différents.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Mise au point de la transfection de siARNs ciblant le transcrit de Drosha

Afin d'étudier le rôle des miARNs sur les fonctions des trophoblastes, nous avons employé les choriocarcinomes de la lignée BeWo. Il s'agit du modèle cellulaire le plus couramment employé pour l'étude de la fusion chez les trophoblastes *in vitro* (Ji *et al.*, 2012). Ces cellules présentent un faible taux de fusion spontanée lequel peut être stimulé par la forskoline (Rote, 2005). L'ajout de cette molécule au milieu de culture a pour conséquence une augmentation dose-dépendante de l'AMPc intracellulaire qui induit la différenciation tant morphologique que biochimique des cellules BeWo *in vitro* (Wice *et al.*, 1990).

Nous avons adopté pour cette étude une approche qui reposait sur l'inhibition de l'expression de l'enzyme Drosha via la technologie de l'ARNi. L'enzyme nucléaire Drosha est impliquée dans la maturation des miARNs (Kim, 2005). L'inhibition de l'expression de cette enzyme permet ainsi d'inhiber la synthèse *de novo* des miARNs (Kuehbach *et al.*, 2007). L'efficacité de transfection du réactif HiPerfect a d'abord été évaluée à l'aide d'un siARN fluorescent. De la fluorescence a été observée en moyenne dans 97% des cellules transfectées : l'efficacité de transfection du réactif HiPerfect est donc élevée chez les cellules BeWo. De plus, aucun stress cellulaire relié à la toxicité du réactif utilisé (présence de vacuoles, cellule de forme arrondie, mortalité cellulaire, etc.) n'a été constaté au moment de l'observation.

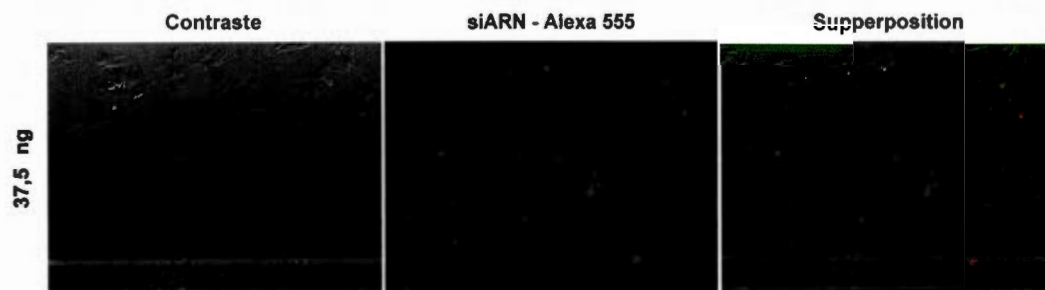


Figure 3.1 Efficacité de transfection du réactif HiPerfect chez les cellules BeWo.

L'efficacité de transfection du réactif HiPerfect a été mesurée par la transfection de cellules BeWo cultivées en plaque de 24 puits en utilisant 37,5 ng d'un siARN fluorescent complexé à 3 μ l de HiPerfect par puits tel que recommandé par le fabricant. 24h post-transfection, les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence à un grossissement de 100X. Le nombre de cellules fluorescentes a été décompté dans trois champs microscopiques par puits. L'efficacité de transfection est exprimée en fonction du pourcentage de cellules fluorescentes.

Après avoir confirmé l'efficacité du réactif de transfection utilisé, le ratio siARN : réactif HiPerfect a été mis au point. Pour chacun des duplexes de siARNs spécifiques testés (siARN1 et siARN2), l'effet recherché a été atteint avec le ratio 37,5 ng de siARN : 3 μ l de HiPerfect. La transfection de siARNs peut affecter l'expression de gènes non ou partiellement homologues (*off-target effets*) (*HiPerfect Transfection Reagent Handbook*, QIAGEN, 2010). Ceci peut être évité en utilisant une faible quantité de siARN. À cet effet, des essais précoces de transfection effectués avec 75 ng de siARN avaient eu pour conséquence d'inhiber la prolifération cellulaire. À l'opposé, une inhibition importante l'expression de Drosha a été observée avec seulement 18,75 ng de siARN (Figure 3.2A). Par contre, cette inhibition a été obtenue en utilisant un volume de HiPerfect de 4,5 μ l. Afin d'amoindrir tout effet lié au réactif de transfection, un volume de 3 μ l de HiPerfect a été priorisé. Enfin, l'inhibition de l'expression de Drosha a été étudiée dans le temps. Dès 24h post-transfection, une inhibition importante de son expression a été mesurée par immunobuvardage de type Western (Figure 3.2B) tant pour siARN1 que siARN2. Par contre, l'inhibition mesurée était plus soutenue avec le duplexe siARN2 (48h). Ainsi, en raison de l'inhibition plus importante et davantage soutenue obtenue par la transfection du duplexe siARN2, la suite des expériences a été conduite avec le duplexe siARN2.

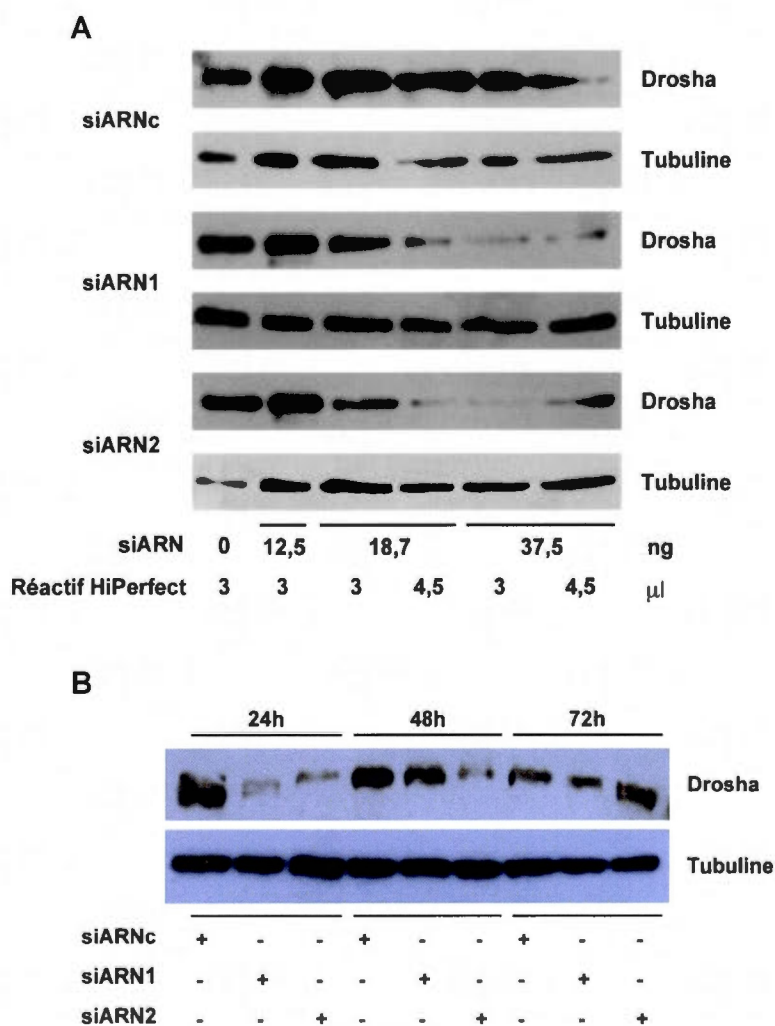


Figure 3.2 Mise au point de la transfection de siARNs ciblant le transcrite de la protéine nucléaire Drosha dans les cellules de la lignée BeWo.

A) Expression de la protéine Drosha par immunobuvardage de type Western 48h suivant la transfection de siARN spécifiques (siARN1 et siARN2) ou témoin (siARNc) en faisant varier la quantité de siARN employée (0, 12,5, 18,75 et 37,5 ng) et le volume d'agent de transfection utilisé (3 et 4,5 μ l). B) Expression de la protéine Drosha par immunobuvardage de type Western 24, 48 et 72h suivant la transfection de cellules BeWo avec 37,5 ng de siARN complexé à 3 μ l de HiPerfect par puits. L'expression de Drosha a été rapportée sur l'expression du gène référence α -tubuline.

3.2 La mise au point de la transfection de siARNs permet d'inhiber fortement l'expression de Drosha.

L'efficacité de l'inhibition de l'expression de Drosha a par la suite été mesurée tant chez les cellules différenciées que les cellules non différenciées. Par conséquent, elle a été quantifiée par qRT-PCR et immunobuvardage de type Western 24h suivant le traitement à la forskoline. Une inhibition de l'expression de la protéine d'environ 85% a été atteinte tant chez les cellules différenciées que chez les cellules non traitées à la forskoline (Figure 3.3B). L'expression du transcrit n'a quant à elle diminué que d'environ 50% suite à la transfection du siARN spécifique siARN2 (Figure 3.3A). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les duplexes de siARNs transfectés agiraient comme des miARNs : les transcrits ciblés ne seraient pas immédiatement clivés puis dégradés, mais seraient plutôt déstabilisés et/ou séquestrés dans un compartiment cellulaire suivant leur appariement avec un siARN.

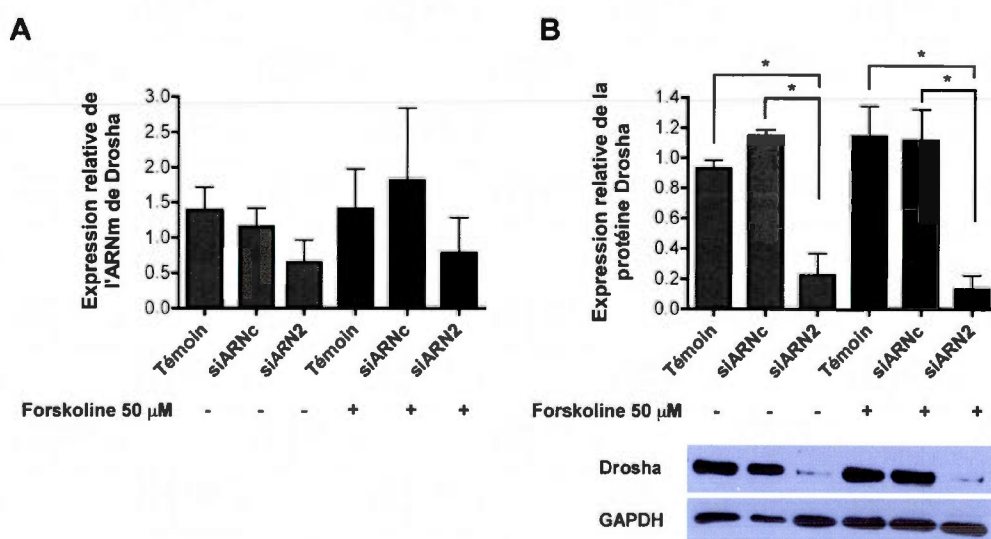


Figure 3.3 Inhibition transitoire de l'expression de Drosha par de petits ARNs interférents.

L'expression de Drosha a été quantifiée chez des cellules de la lignée BeWo 48h suivant la transfection d'un siARN spécifique (siARN2) ou témoin (siARNc) par qRT-PCR (A) et immunobuvardage de type Western (B). 24h suivant la transfection, le traitement à la forskoline a été appliqué pour une période de 24h. (n=3, *p < 0,001 ; moyenne \pm SD ; ANOVA One Way, Toker-Kramer).

3.3 Les miARNs inhibent la différenciation morphologique des trophoblastes *in vitro*.

Suite à la mise au point de la transfection des siARNs, l'effet de l'inhibition de Drosha sur la différenciation des trophoblastes a pu être étudié. Lors de leur différenciation, les cellules placentaires subissent une différenciation à la fois morphologique et biochimique. La différenciation morphologique est caractérisée par la formation de syncytia (Wice *et al.*, 1990) et peut être observée en microscopie par la technique d'immunofluorescence (Figure 3.4). Un syncytium est défini comme deux noyaux ou plus partageant le même cytoplasme. Le pourcentage de noyaux présents dans un syncytium (index de fusion) est utilisé afin de quantifier la fusion cellulaire observée (Mounier *et al.*, 2009). Au cours de cette expérience, un taux de fusion spontané moyen de 5,3% a été mesuré chez les cellules témoin. Chez cellules ayant été traitées à la forskoline, la valeur moyenne de l'index de fusion est quant à elle de 10,7%. À la figure 3.5, comme le taux de fusion est variable d'une expérience à l'autre, les valeurs de l'index de fusion ont été exprimés en rapport au taux de fusion des cellules témoins. 72h suivant la transfection du duplexe siARN2, une augmentation moyenne du taux de fusion cellulaire de 3,0% et de 5,1% par rapport au témoin ont été respectivement mesurées chez les cellules non différenciées et chez les cellules ayant été traitées à la forskoline. Cela indique que la déplétion des miARNs est suffisante pour induire la différenciation morphologique des cellules BeWo *in vitro*.

Lors de leur différenciation, les cellules placentaires subissent également une différenciation biochimique caractérisée par la production et la sécrétion d'une variété d'hormones. La sécrétion de la β -hCG est un marqueur précoce de ce phénomène. Cette hormone a été dosée dans le surnageant de culture à l'aide d'un test ELISA 72h suivant la transfection des cellules BeWo (Figure 3.5B). Chez les cellules n'ayant pas été traitées à la forskoline, aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements. Les résultats obtenus semblent indiquer que, contrairement à la formation de syncytia, la déplétion globale des miARNs n'a pas d'incidence sur la sécrétion de β -hCG par les cellules BeWo en culture.

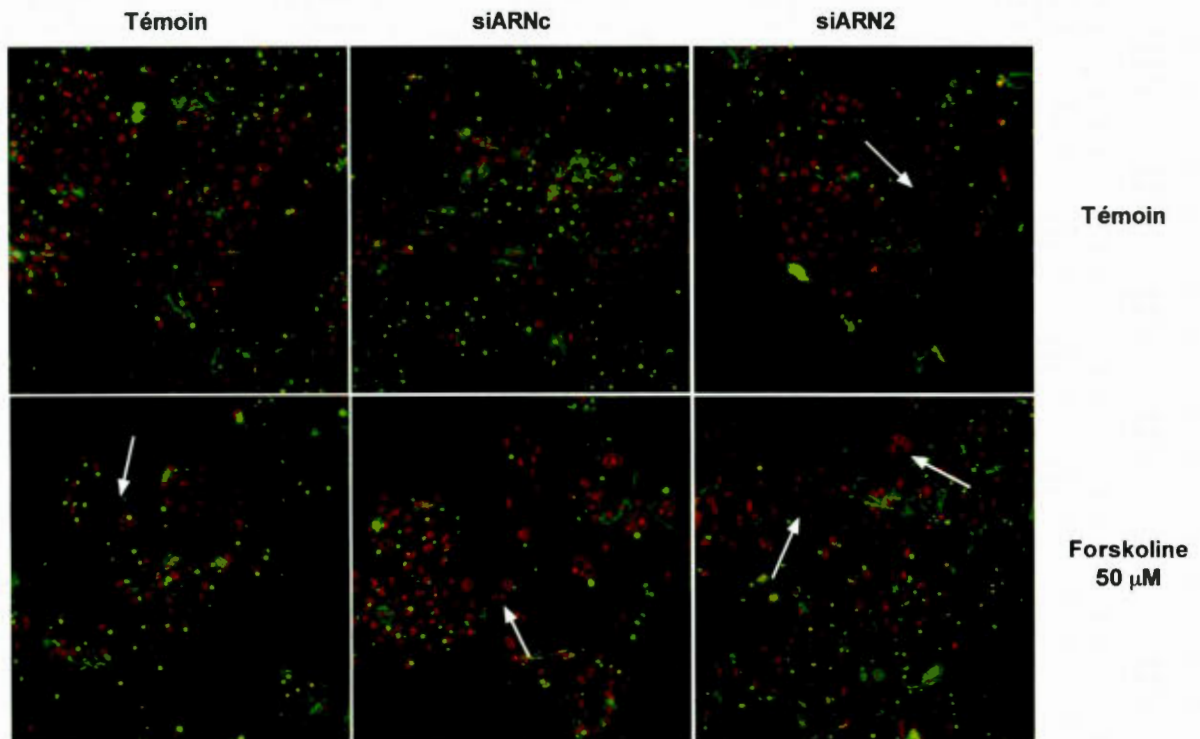


Figure 3.4 Effet de la déplétion globale des miARNs sur la fusion cellulaire chez les cellules BeWo.

Des cellules BeWo ont été transfectées avec un siARN spécifique ciblant la protéine Drosha (siARN2) ou un siARN témoin (siARNc). Les cellules désignées témoin n'ont pas été transfectées. 24h post-transfection, les cellules ont été traitées à la forskoline durant 24h. La différenciation morphologique des cellules a été mesurée 72h suivant la transfection. Afin de mesurer la différenciation morphologique, les cellules ont été fixées puis marquées avec un anticorps spécifique dirigé contre une protéine desmosomale (vert). Les noyaux ont été colorés à l'iodure de propidium (rouge). Les cellules ont été observées en microscopie confocale à l'aide d'un objectif de 20X. La présence d'un syncytium est indiquée à l'aide d'une flèche blanche. (n=3).

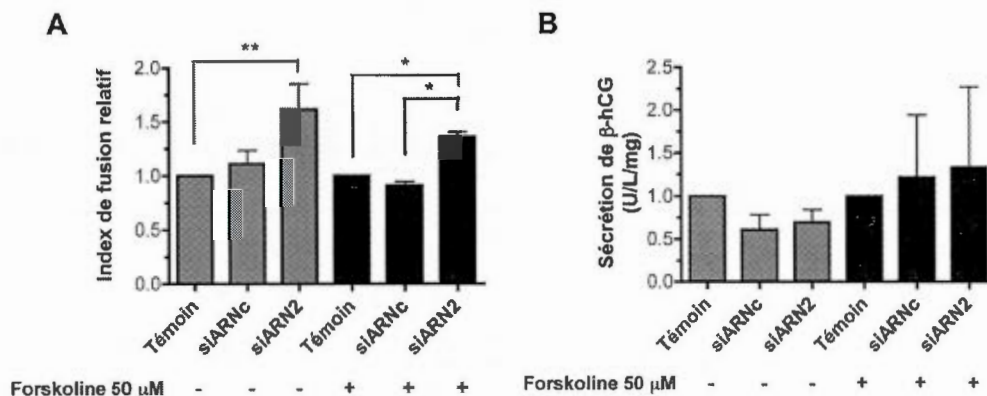


Figure 3.5 Effet de la déplétion globale des miARNs sur la différenciation des cellules BeWo *in vitro*.

Des cellules BeWo ont été transfectées avec un siARN spécifique ciblant la protéine Drosha (siARN2) ou un siARN témoin (siARNc). Les cellules désignées témoin n'ont pas été transfectées. 24h post-transfection, les cellules ont été traitées à la forskoline durant 24h. La différenciation morphologique et biochimique des cellules ont été mesurées 72h suivant la transfection. A) L'index de fusion est le pourcentage de noyaux présents dans un syncytium par rapport au nombre total de noyaux présents. Les données obtenues sont le résultat de trois expériences indépendantes ($n=3$). Les résultats sont exprimés comme le ratio des cellules témoin dont la valeur est de 1. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$; moyenne \pm SD ; ANOVA *One-Way*, Tukey-Kramer). C) La différenciation biochimique a été quantifiée par le dosage de la β -hCG sécrétée dans les surnageants de culture à l'aide d'un test ELISA. Le contenu protéique des surnageants a été dosé par la méthode BCA. Les données recueillies chez les cellules traitées à la forskoline sont le résultat de deux expériences indépendantes ($n=2$). Les résultats sont présentés comme le ratio des cellules témoin dont la valeur est de 1. ($n=3$, moyenne \pm SD).

3.4 L'augmentation de la fusion cellulaire mesurée pourrait être le résultat d'une augmentation de l'expression de Syncytine-2.

Dans le but d'aiguillonner notre étude, nous avons cherché à découvrir si l'augmentation de la fusion cellulaire mesurée pourrait être attribuée à un changement de l'expression de protéines impliquées dans la fusion des trophoblastes. Les protéines à l'étude incluent le facteur de transcription GCM1 (Baczyk *et al.*, 2009) qui régule la transcription des glycoprotéines d'origine rétrovirale Syncytine-1 (Yu *et al.*, 2002) et Syncytine-2 (Liang *et al.*, 2010). Le phénomène de fusion cellulaire s'accompagne également d'une augmentation de l'expression du récepteur membranaire MFSD2A (Toufaily *et al.*, 2013) et de l'expression des protéines de jonction GJA1 (Dunk *et al.*, 2012) et TJP1 (Pidoux *et al.*, 2010). L'expression du transcrit de ces protéines a donc été quantifiée par qRT-PCR 48h suivant la transfection de siARNs spécifiques (Figure 3.6). Aucune différence significative n'a été observée chez l'ensemble des gènes étudiés entre les cellules transfectées avec le siARN témoin (siARNc) et siARN spécifique (siARN2). Par ailleurs, une diminution significative de l'expression de GCM1 a été mesurée entre les cellules transfectées et les cellules non traitées. Cela suggère que le réactif de transfection ou la transfection elle-même pourrait être responsable de la diminution de l'expression constatée pour les transcrits de GCM1, GJA1, TJP1 et MFSD2A (Figure 3.6B). Par contre, les données suggèrent une augmentation de l'expression du transcrit de Syncytine-2 tant chez les cellules traitées à la forskoline que les cellules non différenciées. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'effet d'un miARN sur l'expression de son gène cible est en général plutôt modéré (Baek *et al.*, 2008).

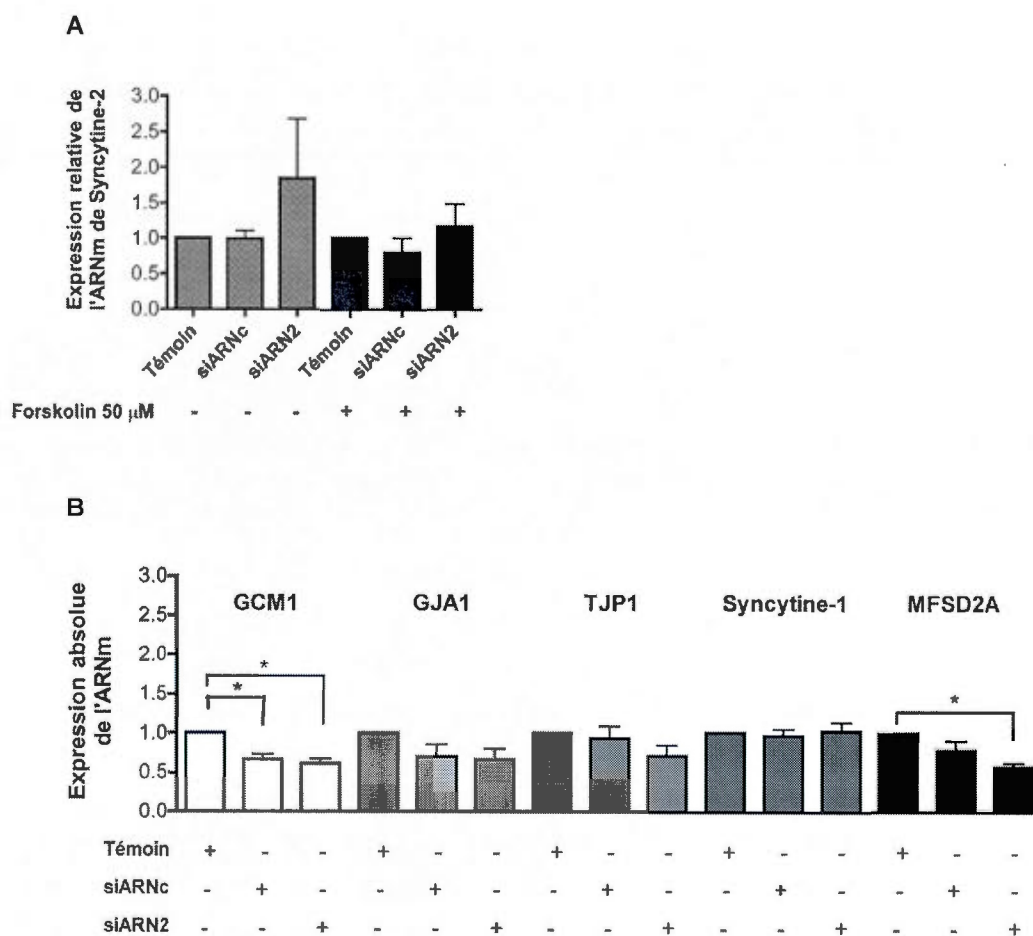


Figure 3.6 Effet de l'inhibition de Drosha sur l'expression du transcrit de protéines impliquées dans la fusion cellulaire chez les trophoblastes.

L'expression du transcrit de Syncytine-2 (A) ainsi que de plusieurs autres protéines (B) impliquées dans la différenciation morphologique des cellules placentaires a été quantifiée par qRT-PCR 48h suivant la transfection d'un siARN spécifique (siARN2) ou témoin (siARNc) dans les cellules BeWo. Les résultats sont exprimés comme le ratio des cellules dites témoin qui n'ont pas été transfectées. (n=3, *p < 0,05 ; ANOVA One Way).

3.5 Des analyses *in silico* mettent en évidence deux familles de miARNs régulant l'expression de Syncytine-2.

L'augmentation de l'expression de Syncytine-2 observée suite à l'inhibition de la voie de biosynthèse des miARNs laisse présager que ceux-ci régulent l'expression de Syncytine-2. Afin de déterminer quels miARNs sont impliqués dans la régulation de l'expression de cette protéine, des analyses *in silico* ont été réalisées à l'aide des algorithmes TargetScan et miRanda. TargetScan fut l'un des premiers algorithmes mis au point. Cet algorithme visant à prédire les cibles des miARNs construit d'abord ses prédictions sur la stringence de la complémentarité de la séquence *seed*, mais également sur le nombre de sites de liaison supposés et, surtout, le degré de conservation des différents sites. TargetScan inclut également dans le calcul de ses prédictions un « context score » qui considère des facteurs influençant l'accessibilité au site cible. MiRanda est quant à lui un algorithme qui fonde ses prédictions sur la complémentarité de presque tout le miARN avec la séquence cible présumée, mais accorde tout de même davantage de poids à la complémentarité de la séquence *seed*. Contrairement à TargetScan, cet algorithme tolère la présence d'un appariement non-canonique de type G·U (G·U *wobble*) très commun chez les hybrides ARN-ARN ou de mésappariements dans la séquence *seed*. Les miARNs identifiés par les deux algorithmes ont été caractérisés et sont présentés dans le tableau 3.1. Au total, 20 miARNs candidats ont été retenus. Des alignements de séquences multiples ont permis de mettre en évidence parmi ceux-ci deux groupes de miARNs. Ces groupes ont été formés en regroupant les miARNs partageant la même séquence *seed* (Figure 3.7). Ainsi, les miARNs miR-106a, -20b, -106b, -93, -17, -20a et -519d constituent le premier groupe fonctionnel. Fait intéressant, à l'exception de miR-519d, tous les miARNs de ce groupe sont membres de la même famille (miR-17). De plus, en raison de leur localisation chromosomique, plusieurs sont situés dans la même grappe de gènes (Tableau 3.1). miR-519d est quant à lui membre de la famille miR-515. Cette famille de miARNs fait partie de la grappe de miARNs C19MC exprimé exclusivement dans le placenta. Plusieurs membres de la famille miR-515 ciblent d'ailleurs des sites non conservés sur le transcrit de Syncytine-2 (Tableau 3.2). Enfin, le second groupe de miARNs à avoir été mis en évidence inclut les miARNs miR-424, -497, -195, -15a, -15b et -16 dont la majorité des membres appartiennent à la famille miR-15 (Tableau 3.1). Cette approche hétérodoxe a donc permis d'identifier deux sites de liaison aux miARNs dans la région 3'-UTR du transcrit de Syncytine-2.

Tableau 3.1 MiARNs ciblant des sites conservés sur le transcrit de Syncytine-2.

Des analyses bioinformatiques ont été réalisées à l'aide des algorithmes MiRanda et TargetScan afin d'identifier les miARNs ciblant la séquence 3'-UTR du transcrit de Syncytine-2. Les miARNs identifiés par les deux algorithmes ont été caractérisés. Un score ou un percentile élevé indique une forte probabilité que le miARN candidat cible le transcrit.

miARN	Score MiRanda	Percentile TargetScan	Chr ^a	Famille
miR-182	70	53	7q33.2	miR-182
miR-140-5p	134	84	16q22.1	miR-140
miR-370	152	97	14q32.2	miR-370
miR-22	356	50	17p13.3	miR-22
miR-382	564	30	14q32.31	miR-154
miR-488	1033	96	1q25.2	miR-488
miR-590-3p	1087	72	7q11.23	miR-590
miR-106a	758	59	Xq26.2	miR-17
miR-20b	864	59	Xq26.2	miR-17
miR-106b	761	59	7q22.1	miR-17
miR-93	764	56	7q22.1	miR-17
miR-17	758	59	13q31.3	miR-17
miR-20a	758	59	13q31.3	miR-17
miR-519d	766	65	19q13.42	miR-515
miR-424	911	79	Xq26.3	miR-322
miR-497	913	81	17p13.1	miR-497
miR-195	915	78	17p13.1	miR-15
miR-15a	911	87	13q14.2	miR-15
miR-15b	912	85	3q25.33	miR-15
miR-16	915	78	13q14.2	miR-15

^aChr : localisation chromosomique du gène de miARN

Tableau 3.2 MiARNs membres de la famille miR-515 ciblant des sites peu conservés sur le transcrit de Syncytine-2.

Des analyses bioinformatiques ont été réalisées à l'aide des algorithmes MiRanda et TargetScan afin d'identifier les miARNs ciblant la séquence 3'-UTR du transcrit de Syncytine-2. Les miARNs identifiés par les deux algorithmes ont été caractérisés. Un score ou un percentile élevé indique une forte probabilité que le miARN candidat cible le transcrit.

miARN	Score MiRanda	Percentile TargetScan	Chr ^a
miR-520h	765	64	19q13.42
miR-520g	765	64	19q13.42
miR-519b-3p	765	47	19q13.42
miR-519c-3p	765	47	19q13.42
miR-516a	765	91	19q13.42
miR-526b*	7666	-	19q13.42
miR-522	933	76	19q13.42
miR-516b*	157	-	19q13.42

^aChr : localisation chromosomique du gène de miARN

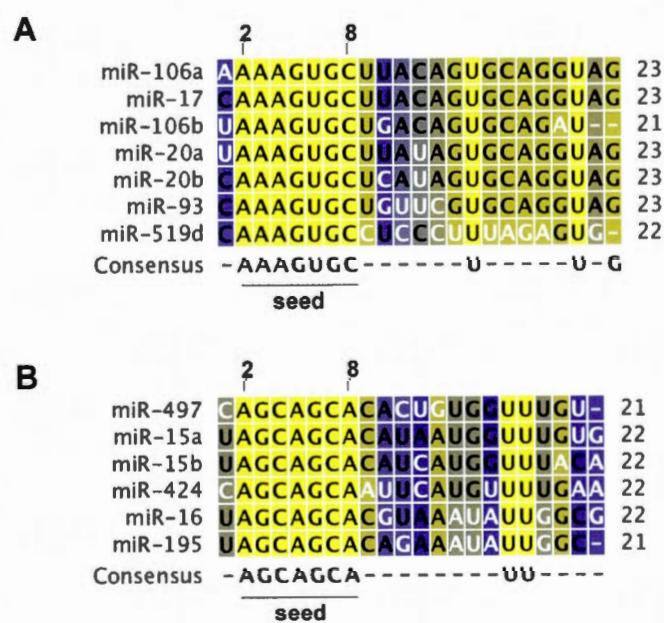


Figure 3.7 Deux groupes fonctionnels de miARNs ont été mis en évidence par des études de séquence.

Des alignements de séquences multiples ont été réalisés à l'aide du logiciel CLC Workbench afin d'analyser la séquence des miARNs ciblant le segment 3'-UTR de Syncytine-2. A) Tous les membres du premier groupe fonctionnels de miARNs candidats ont en commun la séquence *seed* 5'-AAAGUGC-3' en position 2-8. B) Les membres du second groupe fonctionnel partagent la séquence *seed* 5'-AGCAGCA-3'.

Les sites de liaison putatifs dans le segment 3'UTR de Syncytine-2 des miARNs membres des groupes fonctionnels (Figure 3.7) sont présentés à la Figure 3.8. L'efficacité d'un miARN à inhiber l'expression de sa cible dépend de plusieurs facteurs (Bartel, 2009). Parmi ceux-ci, il a été démontré que la présence d'un site de liaison environ 15 nt en aval du codon stop et/ou loin du centre des longs segments 3'-UTR augmente l'efficacité de l'inhibition par les miARNs : l'emplacement de ces sites facilite la liaison du complexe RISC (Grimson *et al.*, 2007). La composition nucléotidique aux environs immédiats d'un site de liaison a également un impact sur l'efficacité d'un miARN à inhiber l'expression du transcrit cible. Une composition riche en AU a été retrouvée aux environs des sites les plus efficaces (Bartel, 2009). Également, le nombre de sites de liaison pour un ou plusieurs miARNs présents sur le transcrit est un facteur déterminant de la fonction des miARNs. Chez les transcrits avec plus d'un site de liaison, l'activité globale des miARNs mesurée correspond à la somme de la contribution de chacun des sites présents à l'inhibition de l'expression du transcrit. Cette action non coopérative peut par contre résulter en une inhibition significative si le nombre de sites présents est important. Bien qu'étant une exception, il a cependant été observé que deux sites qui sont près l'un de l'autre (séparés par moins de 40 nt, mais plus de 8 nt) tendent à agir de manière coopérative (Bartel, 2009 ; Cheng, Bhardwaj et Gerstein, 2009 ; Hon et Zhang, 2007).

En conclusion, considérant le nombre important de miARNs se liant sur chacun des sites de liaison identifiés sur le transcrit de Syncytine-2, l'activité globale de l'ensemble des miARNs candidats pourrait résulter en une inhibition importante de l'expression de Syncytine-2.

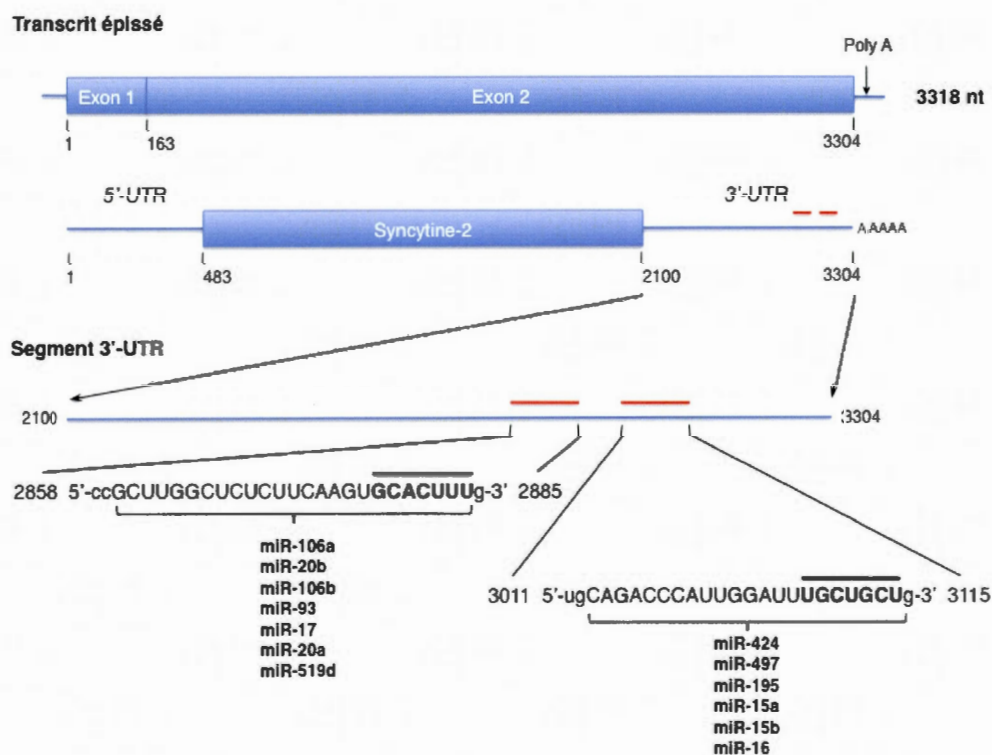


Figure 3.8 Sites de liaison putatifs des miARNs candidats sur le transcrit de Syncytine-2.

Des analyses bioinformatiques à l'aide du logiciel miRanda ont permis de connaître l'emplacement des sites de liaison putatifs des miARNs ciblant le transcrit de Syncytine-2. Le site de liaison (rouge) pour chacun des groupes fonctionnels identifiés est représenté en majuscule. Les nucléotides complémentaires à la séquence *seed* des miARNs sont mis en évidence par un trait (en gras).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La formation et le maintien du ST sont essentiels à une grossesse saine (Huppertz, Bartz et Kokozidou, 2006). Une hypothèse récente suggère d'ailleurs que l'échec précoce de la différenciation des cytotrophoblastes villosités serait à l'origine des complications de grossesse idiopathiques communes que sont la PE et le RCIU (Aplin, 2010 ; Huppertz, 2008 ; Newhouse *et al.*, 2007). Les mécanismes qui régulent la fusion des trophoblastes sont encore aujourd'hui peu connus (Huppertz et Gauster, 2011). Cependant, un nombre important d'auteurs a rapporté dans les dernières années que l'expression de plusieurs miARNs est dérégulée dans les placentas de grossesses compliquées par la PE (Enquobahrie *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2009 ; Mayor-Lynn *et al.*, 2010 ; Pineles *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2009) et le RCIU (Mouillet *et al.*, 2010 ; Prieto et Markert, 2011).

Au cours de cette étude, la biosynthèse *de novo* des miARNs a été inhibée chez les cellules de la lignée BeWo afin de découvrir si les miARNs participent à la régulation de la différenciation à la fois morphologique et biochimique des trophoblastes humains. Les résultats obtenus suggèrent que les miARNs sont des régulateurs négatifs de la différenciation morphologique des cellules BeWo *in vitro* : une augmentation de la fusion cellulaire a été constatée dans les cellules où la synthèse *de novo* des miARNs avait été inhibée. Par ailleurs, il est important de souligner que l'inhibition de l'expression de Drosha était suffisante afin d'induire une augmentation moyenne de la fusion cellulaire de 3,0%. Ceci suggère que les miARNs ont un rôle essentiel dans ce processus puisque l'inhibition, même partielle, de l'expression des miARNs matures a eu un effet physiologique significatif (Kuehbachner *et al.*, 2007). Par contre, la différenciation morphologique des CT en ST n'était pas accompagnée d'une augmentation de la sécrétion d'hCG dans le surnageant de culture. Ceci semble indiquer que ces phénomènes sont régulés indépendamment et que la fusion

cellulaire précéderait la différenciation biochimique des cellules placentaires tel que constaté par plusieurs auteurs (Johnstone *et al.*, 2005 ; Newhouse *et al.*, 2007 ; Orendi *et al.*, 2010 ; Pidoux *et al.*, 2012). Il convient tout de même de rester prudent puisque ces deux processus sont synergiques : la fusion cellulaire stimule la production d'hCG qui pousse à son tour les cellules à fusionner (Johnstone *et al.*, 2005). Également, les résultats obtenus chez les cellules traitées à la forskoline présentent une grande variabilité (Rote, 2005). Ces résultats ont été obtenus à la suite de seulement deux expériences indépendantes. Il est donc impératif de répéter cette expérience afin d'augmenter le nombre de réplicats, ce qui devrait permettre de statuer définitivement sur l'effet de la déplétion globale des miARNs sur la différenciation biochimique de cellules traitées à la forskoline.

L'absence apparente de régulation de la différenciation biochimique par les miARNs dans les cellules BeWo pourrait être expliquée par le fait que l'inhibition de Drosha n'affecte la maturation que d'une portion des miARNs (Kuehbachner *et al.*, 2007). En effet, malgré que la voie canonique représente la principale voie de biosynthèse des miARNs, plusieurs d'entre eux sont le produit de voies dites « Drosha-indépendantes » (Miyoshi, Miyoshi et Siomi, 2010). Par conséquent, la régulation de la différenciation biochimique pourrait dépendre de l'activité de miARNs dont l'expression n'est peu ou pas affectée par l'inhibition de Drosha. L'une de ces voies alternatives de biosynthèse est celle des mirtrons. Cette classe émergente de miARNs sont générés par l'épissage de courts introns qui produit un pré-miARN (Curtis, Sibley et Wood, 2012 ; Okamura, Chung et Lai, 2008 ; Ruby, Jan et Bartel, 2007). Chez les mammifères, il a été démontré que le mirtron spécifique aux primates miR-877 cible EFL1 et PP2A dans les hépatocarcinomes de la lignée HepG2 (Sibley *et al.*, 2012). ELF1 est un facteur de transcription qui lie de manière coopérative le facteur de transcription Sp1 (Lim et Chang, 2010). Exprimé de manière ubiquitaire, Sp1 est également exprimé dans le ST et participe *in vitro* à la régulation de la transcription de la β -hCG chez les CT (Knofler *et al.*, 2004). De plus, la présence d'un site de liaison à ELF1 a été démontré dans le promoteur de la cytokine GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) (Miyazaki *et al.*, 1996) qui stimule la différenciation des CT en culture (Gauster *et al.*, 2009). La phosphatase PP2A a quand à elle été rapportée comme régulant l'activité transcriptionnelle de CREB (Wadzinski *et al.*, 1993) qui stimule la transcription de la β -hCG (Delidakis *et al.*, 2011). L'absence de régulation de la différenciation biochimique par les miARNs pourrait également être attribué à la stabilité de certains miARNs qui excèderait l'effet transitoire des siARNs (Kuehbachner *et al.*, 2007). Les miARNs sont en effet reconnus pour leur grande stabilité, certains ayant une demi-vie pouvant aller jusqu'à plus d'une

semaine *in vivo* (Ebert et Sharp, 2010a). Enfin, il est possible que l'implication des miARNs dans la régulation de la différenciation biochimique des trophoblastes soit moins importante que dans la différenciation morphologique.

Il a été constaté au cours de cette étude que les miARNs auraient pour rôle de maintenir les cellules de la lignée BeWo dans un état non différencié. Cette découverte contraste avec les résultats de Forbes *et al.* (2012) qui ont récemment rapporté que l'inhibition de Dicer dans les cellules d'explants de placentas du premier trimestre a eu pour conséquence de stimuler la prolifération cellulaire des CT. Cette apparente contradiction peut être expliquée par la méthodologie qui a été employée. Tout d'abord, contrairement à Drosha, Dicer participe également à la maturation de plusieurs classes de petits ARNs non codants (sncARNs) comme les siARNs et les endo-siARNs (Carthew et Sontheimer, 2009). L'effet observé sur la prolifération cellulaire pourrait donc être le résultat de l'inhibition de l'expression des endo-siARNs par exemple. Également, Kuehbacher *et al.* (2007) ont rapporté que l'inhibition de Dicer avait également pour conséquence de n'inhiber l'expression que d'un sous-groupe de miARNs (Miyoshi, Miyoshi et Siomi, 2010). En second lieu, il est très probable que les différences observées soient le fait du matériel biologique utilisé. Le patron d'expression des miARNs et de leurs cibles varie en effet selon le type ou « contexte » cellulaire (Luo *et al.*, 2009 ; Seitz, 2009). Il serait donc impératif de confirmer les résultats obtenus lors de cette étude chez des CT villeux (Malassine *et al.*, 2007) primaires isolés de placentas humains. Puisque l'expression des miARNs placentaires varie au cours de la grossesse, il serait intéressant d'utiliser des CT villeux isolés de placentas du premier et du troisième trimestre afin d'étudier les rôles des miARNs des grappes C14MC et C19MC respectivement (Morales-Prieto *et al.*, 2012). De plus, l'expression de cinq miARNs a été rapportée comme étant plus élevée dans les cellules de la lignée BeWo (miR-9*, miR-96, miR-203, miR-372 and miR-200a) que les CT primaires alors que l'expression de neuf miARNs y était réduite (miR-199a, miR-199-s, miR-199s*, miR-154, miR-370, let-7b, miR-299, miR-134 and miR-199b). Parmi ceux-ci, il a été allégué que miR-199b pourrait avoir un rôle clé dans la régulation de la prolifération dans les cellules placentaires puisqu'il a été découvert que la surexpression de ce miARN résulte en l'inhibition de la prolifération des choriocarcinomes (Chao *et al.*, 2010). Il est donc plus judicieux d'employer des CT villeux isolés de placentas humains.

Plusieurs expériences devront être menées afin de révéler les mécanismes moléculaires exacts par lesquels les miARNs participent à la différenciation morphologique des cellules placentaires. Le rôle des miARNs dans le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire est très bien documenté (Ivey et Srivastava, 2010). Par conséquent, les miARNs pourraient participer de manière précoce à la différenciation des trophoblastes via la régulation de la progression du cycle cellulaire. Le placenta est en effet un organe très prolifératif (Seifarth *et al.*, 2005) et la séquence des événements prenant place au moment de la fusion cellulaire est encore inconnue (Huppertz et Gauster, 2011). Les miARNs pourraient consolider le programme de différenciation qui pousse les CT à se différencier. Dans le placenta, Tong (2009) a rapporté que l'expression de deux membres du *cluster* miR-17-92 (miR-20a et -20b) a été modifiée dans les cellules BeWo suite à l'ajout de forskoline dans le milieu de culture (Al-Khan *et al.*, 2011). Cette grappe de miARNs est l'un des *clusters* polycistroniques le mieux caractérisé. Il contribue entre autres à moduler la prolifération cellulaire en établissant un seuil d'expression des facteurs de transcription de la famille E2F (Trompeter *et al.*, 2011). Dans le développement, la grappe miR-17-92 a été impliquée dans la morphogenèse des poumons, l'hématopoïèse et le développement du squelette. Malgré tout, les mécanismes moléculaires exacts par lesquels ces miARNs régulent le développement restent encore peu compris (Concepcion, Bonetti et Ventura, 2012). Il a également été démontré par Wu *et al.* (2010) que p21 (CDKN1A) est la cible de plusieurs miARNs membres de la grappe C19MC (miR-515-3p, -519b-3p, -519d, -519e, -520a-3p, -520b, et -520h) dans les choriocarcinomes de la lignée JAR. Chez cette lignée cellulaire, l'expression ectopique de miR-519b-3p et miR-520a-3p a stimulé la prolifération cellulaire et la transition G1/S. Au contraire, l'inhibition transitoire de l'expression de miR-520h, -519d et -515-3p a résulté en une diminution de la prolifération cellulaire et a restauré l'accumulation des cellules en phase G1 (Wu *et al.*, 2010). Les membres des familles miR-519 et miR-520 du C19MC partagent en outre une séquence *seed* quasi identique aux membres de la grappe miR-17-92 (Noguer-Dance *et al.*, 2010). Johnstone *et al.* (2005) ont démontré qu'une augmentation de l'expression de la cycline D1 (CCND1) est essentielle au passage des cellules placentaires de la phase G1 en phase S. CCND1 a été rapportée comme étant la cible de plusieurs miARNs (miRecords, <http://mirecords.biolead.org>) dont les membres de la famille miR-15 et les membres de la grappe miR-17-92 (Cloonan *et al.*, 2008 ; Deshpande *et al.*, 2009). Fait intéressant, l'effet de la réduction globale de l'expression des miARNs sur la progression du cycle cellulaire dans les cellules BeWo a été évalué au cours de cette étude : les résultats préliminaires indiquent une augmentation importante du pourcentage de cellules

en phase S suite à l'inhibition de l'enzyme Drosha (Résultats préliminaires, Figure C.1, Appendice C). Ainsi, afin de faire suite à notre étude, une piste de recherche intéressante serait de quantifier l'expression de la CCND1 et de son inhibiteur p21 par qRT-PCR et, surtout, par immunobuvardage de type Western.

Chez les cellules placentaires, les voies p38 et ERK1/2 régulent la différenciation du trophoblaste villositaire (Daoud *et al.*, 2005 ; Vaillancourt *et al.*, 2009). La littérature fait état de plusieurs miARNs qui stimulent la différenciation cellulaire en ciblant la voie de signalisation des MAPK (Akama *et al.*, 2012 ; Cloonan *et al.*, 2008 ; Ge *et al.*, 2013 ; Oeztuerk-Winder *et al.*, 2012 ; Paroo *et al.*, 2009 ; Spruce *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2012 ; Zhu *et al.*, 2010). Les fonctions des miARNs ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués varient par contre en fonction du contexte cellulaire. À titre d'exemple, Zhu *et al.* (2010) ont rapporté que miR-101 stimule l'activité de p38 dans les macrophages via l'inhibition de l'expression de la phosphatase DUSP1 (*Dual Specificity Phosphatase 1*), un inhibiteur de la voie des MAPK (Zhu *et al.*, 2010). Les miARNs membres de la famille miR-17 ont plutôt été rapportés comme ciblant directement la kinase MAPK9/JNK2 dans les kératinocytes (Wu *et al.*, 2012). Leur action stimule la prolifération cellulaire puisque MAPK9 est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire. L'inhibition de cette kinase stabilise le facteur de transcription JUN, ce qui provoque une augmentation de l'expression de CCND1 (Cloonan *et al.*, 2008). Fait intéressant, l'expression des miARNs a également été rapportée comme étant régulée par la voie des MAPK chez les cellules HeLa (Oeztuerk-Winder *et al.*, 2012 ; Paroo *et al.*, 2009). L'axe MKK1/ERK2/TRBP stimule la biosynthèse des miARNs dans les cellules de cette lignée cellulaire en stabilisant le complexe TRBP/Dicer. La phosphorylation de TRBP induit la prolifération et la survie cellulaire et résulte notamment en une augmentation de l'expression de miR-17, -20a et -92a (Paroo *et al.*, 2009). En définitive, les résultats obtenus au cours de cette étude pointent vers le fait que les miARNs sont des régulateurs négatifs de la différenciation cellulaire. Nous proposons donc l'hypothèse que les miARNs participent de manière très précoce à la différenciation des trophoblastes en poussant les CT à proliférer juste avant la fusion avec le ST en réponse à l'activation de la voie des MAPK par divers hormones, facteurs de croissance et cytokines présents dans le milieu (Gauster *et al.*, 2009 ; Huppertz et Gauster, 2011 ; Vaillancourt *et al.*, 2009). Par conséquent, il serait intéressant de mesurer l'activité du promoteur du *cluster* de miARNs miR-17-92 dans les trophoblastes en réponse à l'ajout de forskoline chez des cellules BeWo cultivées dans un milieu sans sérum ou suite à un traitement avec des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des voies ERK1/2 et p38 (Delidakis *et al.*, 2011). L'activité et l'expression de ERK1/2, MAPK8/9 et

MAPK11/14 pourraient également être mesurées suite à l'inhibition de l'activité des membres de la famille miR-17.

Cependant, il n'est pas à écarter que les miARNs participent à la différenciation des cellules placentaires en régulant le processus d'apoptose prenant place chez les CT. Ce processus est étroitement enchevêtré dans la différenciation des CT en ST (Chen *et al.*, 2011 ; Heazell et Crocker, 2008 ; Huppertz, 2006 ; Jurisicova, Detmar et Caniggia, 2005). À cet effet, Oeztuerk-Winder *et al.* (2012) ont rapporté que l'expression des miARNs de la grappe miR-17-92 est sous le contrôle de l'axe p38 α /MAPKAPK-2/p53 chez une lignée de cellules endothéliales pulmonaires. Il avait auparavant été démontré que p53 diminuait l'activité du promoteur de miR-17-92 en réponse à l'hypoxie (Yan *et al.*, 2009). Ceci est très intéressant puisque la tension en oxygène constitue un facteur important dans la différenciation de la lignée trophoblastique (Benirschke *et al.*, 2006 ; James, Stone et Chamley, 2006). Il serait donc pertinent de vérifier si le même phénomène peut être observé chez les CT. Ceci permettrait de démontrer un lien entre la prolifération cellulaire et le déclenchement du processus d'apoptose chez les CT qui se différencient. Dans le placenta, p53 est d'ailleurs exprimé majoritairement dans les CT. Il a en outre été démontré que l'expression de ce facteur de transcription augmente chez les cellules qui prolifèrent (Heazell et Crocker, 2008). D'ailleurs, une étude très intéressante a récemment rapporté que p53 régule l'expression de miR-519d en se liant à son transcrit chez des cellules isolées de carcinomes hépatocellulaires (Fornari *et al.*, 2012). Les auteurs ont également rapporté que miR-519d cible les protéines PTEN, AKT3 et TIMP2. PTEN est un antagoniste de la voie de signalisation PI3K/Akt qui stimule l'invasion et la prolifération des cellules trophoblastiques (Dong *et al.*, 2012). Plus précisément, les isoformes AKT1 et AKT3 ont été identifiées comme stimulant la migration des CT (Haslinger *et al.*, 2013). Enfin, il a été rapporté qu'une diminution de l'expression de TIMP2 avait pour conséquence de stimuler l'invasion chez les cellules de la lignée HTR-8/SVneo (Zhang *et al.*, 2012). Il serait donc très intéressant d'étudier l'activité de miR-519d chez les CT primaires. Cela pourrait permettre de découvrir l'une des fonctions du *cluster* de miARNs C19MC et d'ajouter à notre compréhension du développement placentaire. Il conviendrait également de vérifier si p53 régule l'expression de d'autres membres de la grappe C19MC. En terminant, miR-15b et miR-16 ont été rapportés comme régulant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Xia *et al.*, 2008) qui est fortement exprimée chez le ST (Ray, Jurisicova et Caniggia, 2009). Un effort particulier pourrait ainsi être déployé afin de découvrir si l'expression de Bcl-2 est également régulée par ces deux miARNs dans les trophoblastes.

Dans le but de découvrir la cause de l'augmentation de la fusion cellulaire mesurée, l'expression du transcrit de plusieurs protéines impliquées dans la fusion des trophoblastes a été quantifiée. Parmi celles-ci, une augmentation de l'expression du transcrit de Syncytine-2 a été constatée. Quoique non significative, cette augmentation a été jugée d'un grand intérêt puisque bien des miARNs inhibent la traduction de leur cible principalement via la déstabilisation de l'ARNm qui n'est dégradé que quelque temps plus tard (Guo *et al.*, 2010). Il serait donc très intéressant de quantifier l'expression de Syncytine-2 par immunobuvardage de type Western. Si le transcrit de Syncytine-2 est la cible des miARNs, l'inhibition de Drosha devrait s'accompagner d'une augmentation significative de l'expression protéique de Syncytine-2. Également, fait intéressant, un nombre important de miARNs ont été rapportés comme ciblant les lentivirus, les rétrovirus et les séquences rétrovirales endogènes (HERVs) (Hakim *et al.*, 2008). Syncytine-2 constitue donc un sujet d'étude très pertinent. Il est probable que le transcrit de cette glycoprotéine d'origine rétrovirale soit ainsi la cible de plusieurs miARNs et constitue l'un des mécanismes moléculaires par lesquels les miARNs régulent la différenciation morphologique des trophoblastes. Enfin, l'expression de GCM1, GJA1, TJP1, Syncytine-1 et MFSD2A devrait également être mesurée par immunobuvardage de type Western. En effet, tel que constaté au cours de cette étude, la transfection de siARNs peut s'accompagner d'une diminution significative de l'expression protéique du gène d'intérêt, mais non de l'expression du transcrit. De plus, le protocole expérimental devrait inclure un témoin consistant en des cellules incubées en présence de l'agent de transfection HiPerfect seulement (*mock-transfected cells*). Cela permettrait de déterminer si la diminution de l'expression du transcrit des protéines GCM1, GJA1, TJP1, Syncytine-1 et MFSD2A mesurée suite à la transfection de siARNs non spécifiques (siARNc) pourrait être attribuée à un effet « *off-target* » du siARNc ou à la transfection elle-même.

Afin de déterminer quels miARNs seraient impliqués dans la régulation de l'expression de Syncytine-2, des analyses *in silico* ont été réalisées à l'aide des algorithmes TargetScan et miRanda. Cela a permis de découvrir que l'expression du transcrit de Syncytine-2 serait régulée par les membres des familles miR-17 et miR-15 qui partagent respectivement les séquences *seed* AAAGUGC et AGCAGCA. Dans la littérature, des expériences de protéomique et de bioinformatique ont démontré que la séquence *seed*, les nucléotides en position 2 à 8 à partir de l'extrémité 5' du miARN, est le principal déterminant de l'activité d'un miARN (Baek *et al.*, 2008). Il est donc possible de spéculer que les miARNs qui partagent la même séquence *seed* ciblent des groupes de gènes se chevauchant (Concepcion, Bonetti et Ventura, 2012). Par exemple, tel qu'illustré au Tableau 4.1, presque tous les membres de la

famille miR-17 ciblent les gènes codant VEGFA, p21/CDKN1A et E2F1. Par conséquent, ces miARNs ont été regroupés dans la même famille. Plusieurs des miARNs candidats sont également membres d'une même grappe de miARNs (Tableau 4.1). Cet arrangement en grappe révèle que l'expression de ces miARNs est régulée par les mêmes facteurs et qu'ils sont donc exprimés au même moment (Friedman et Jones, 2009). Par contre, il est important de souligner que les membres d'une même grappe de miARNs ne sont pas nécessairement exprimés au même niveau tel que démontré au tableau 4.1 : le degré d'expression de chacun des miARNs dépend entre autres de leur stabilité (Concepcion, Bonetti et Ventura, 2012). Tout cela suggère donc que l'expression du transcrit de Syncytine-2 est sous le contrôle de plus d'un miARN à la fois. Par conséquent, alors que l'activité d'un seul miARN sur sa cible est plutôt modéré, l'activité globale de l'ensemble des miARNs appartenant à un groupe fonctionnel devrait résulter en une forte inhibition de l'expression du transcrit ciblé.

Tableau 4.1 Expression des miARNs candidats dans le placenta.

miARN	Famille	Grappe	Placenta ^{a,b}	Cible(s) confirmée(s) ^c
miR-182	miR-182	-	-	ADCY6, MITF, RARG, IGF-IR
miR-140-5p	miR-140	-	+	VEGFA, IGFBP5, HDAC4
miR-370	miR-370	-	-	MAP3K8
miR-22	miR-22	-	+	ESR1, PPAR α , BMP7, MAX, ESR1, PTEN
miR-382	miR-154	-	-	-
miR-488	miR-488	-	-	-
miR-590-3p	miR-590	-	-	-
miR-17	miR-17	miR-17-92	+	VEGFA, CDKN1A, p53, MAP3K12, CREB1, RUNX1, BMPR2, MEF2D, BCL2, VIM, BIM, EDG1, JAK1, IL-8, CCND1, NCOA3
miR-20a	miR-17	miR-17-92	+	VEGFA, MAP3K12, RUNX1, BMPR2, MEF2D, BCL2, BIM, EDG1, JAK1, IL-8, CCND1, E2F1
miR-106a	miR-17	miR-106a-363	-	VEGFA, CDKN1A, Rb1, APP, RUNX1
miR-20b	miR-17	miR-106a-363	-	VEGFA, ESR1
miR-106b	miR-17	miR-106b-25	-	VEGFA, CDKN1A, E2F1, ITCH
miR-93	miR-17	miR-106b-25	+	VEGFA, CDKN1A, E2F1, FUS1
miR-519d	miR-515	C19MC	+	CDKN1A
miR-424	miR-322	miR-424-450b	++	VEGF, VEGFR2, MAP2K1, FGFR1, PLAG1, NFIA
miR-497	miR-497	miR-497-195	+	-
miR-195	miR-15	miR-497-195	-	E2F3, CCND1, CDK6
miR-15a	miR-15	miR-15a-16-1	+	BCL2, VEGFA, CREBL2, MYB, CCND1
miR-15b	miR-15	miR-15b-16-2	+	BCL2, CCNE1, RECK, MKK4, BMI1
miR-16	miR-15	miR-15a-16-1	++	BCL2, ARL2

- : non exprimé, + : faiblement exprimé, ++ : modérément exprimé

^a Luo *et al.* (2009)^b microARNs.org : base de données des patrons d'expression expérimentaux des miARNs (<http://www.microma.org/microma/getExprForm.do>)^c miRecords : base de données de cibles confirmées expérimentalement (<http://mirecords.biolead.org>)

Tableau 4.2 Caractérisation des miARNs de la famille miR-515 ciblant le transcrit de Syncytine-2.

miARN	Grappe	Placenta ^{a,b}	Cible(s) confirmée(s) ^c
miR-520h	C19MC	-	VEGFA, CDKN1A, ABCG2
miR-520g	C19MC	+	VEGFA
miR-519b-3p	C19MC	+	CDKN1A
miR-519c-3p	C19MC	+	ABCG2
miR-516a	C19MC	-	KLK10, SULF1
miR-526b*	C19MC	-	-
miR-522	C19MC	+	-
miR-516b*	C19MC	-	-

non exprimé, + : faiblement exprimé, ++ : modérément exprimé

^a Luo *et al.* (2009)

^b microARNs.org : base de données des patrons d'expression expérimentaux des miARNs (<http://www.microma.org/microma/getExprForm.do>)

^c miRecords : base de données de cibles confirmées expérimentalement (<http://mirecords.biolead.org>)

Les algorithmes de prédiction sont les outils les plus utilisés afin d'étudier les relations entre les miARNs et leurs cibles (Huang *et al.*, 2010 ; Lindow, 2011 ; Mendes, Freitas et Sagot, 2009 ; Ulitsky, Laurent et Shamir, 2010). Par contre, en raison de leur taux de faux positifs élevés, ces algorithmes ne peuvent que servir de guides. Afin de circonvenir à ce problème, il est devenu pratique courante de se concentrer sur la validation des cibles prédites par de multiples algorithmes tel qu'il a été fait dans cette étude. Malheureusement, cette approche mène à négliger des cibles fonctionnelles importantes (Thomas, Lieberman et Lal, 2010). En effet, l'utilisation de données expérimentales a permis à plusieurs auteurs d'évaluer la performance de certains algorithmes. Les algorithmes se basant sur la conservation des sites se liant à la séquence *seed* comme TargetScan ont présenté la meilleure performance (Bartel, 2009 ; Thomas, Lieberman et Lal, 2010 ; Wu *et al.*, 2010). Par contre, des données récentes ont démontré que les sites non conservés peuvent être aussi nombreux que les sites conservés et avoir un impact aussi important sur la synthèse protéique (Grimson *et al.*, 2007). De plus, des appariements non canoniques de type G·U sont également présents chez plusieurs cibles confirmées. Par contre, la majorité des algorithmes existants ne tolèrent pas de mésappariements ou d'appariements non canoniques dans la région *seed*. Cela a pour conséquence que bien des cibles confirmées n'ont jamais été prédites par les principaux algorithmes utilisés (Betel *et al.*, 2010). Aussi, le segment 3'-UTR est la seule région considérée par la plupart des algorithmes de prédiction (Lee *et al.*, 2009). Pourtant, la présence de sites de liaison dans les régions codantes a été confirmée par plusieurs auteurs (Schnall-Levin *et al.*, 2011). Les algorithmes de prédiction utilisent également des séquences 3'-UTR provenant de différentes bases de données, introduisant des divergences entre les prédictions (Thomas, Lieberman et Lal, 2010). Enfin, il n'a été que récemment confirmé expérimentalement par Wu *et al.* (2010) que plusieurs miARNs peuvent simultanément réguler l'expression d'un même gène. Cette découverte constitue un grand avancement dans le domaine d'étude des cibles des miARNs puisque, comme il a été avancé plus tôt, cela suggère qu'il s'agit de la combinaison de l'activité de chacun de ces miARNs qui détermine le niveau d'expression d'une cible (Peter, 2010). Malheureusement, aucune des méthodes présentement utilisées afin de prédire les cibles des miARNs n'est capable d'identifier des connections de cette complexité (Thomas, Lieberman et Lal, 2010).

Cependant, tel qu'illustré dans les tableaux 4.1 et 4.2, certains miARNs candidats ne sont peu ou pas exprimés dans le placenta. Puisqu'un miARN et sa cible se doivent d'être exprimés dans la même fenêtre spatio-temporelle, les expériences subséquentes devraient

par conséquent être concentrées sur les miARNs membres des familles miR-15, miR-515 et miR-17. Par contre, afin de s'assurer que Syncytine-2 est une cible véritable des miARNs candidats, il est impératif d'effectuer les expériences dans un contexte endogène. Une approche perte-de-fonction du miARN d'intérêt est par conséquent la meilleure approche à utiliser (Wang *et al.*, 2007). Nous proposons ainsi d'employer des inhibiteurs compétitifs spécifiques désignés « éponges à miARNs » (*miRNA sponges*) afin de confirmer les données bioinformatiques obtenues.

En 2007, l'équipe de Bert, Neilson et Sharp ont créé et perfectionné la première éponge à miARNs : leur but était alors de mettre au point une approche permettant de dépasser les limites imposées par l'utilisation d'oligonucléotides nommés antagomirs (Krutzfeldt *et al.*, 2007). Ces oligonucléotides antisens chimiquement modifiés sont utilisés afin d'inhiber l'expression d'un miARN spécifique (Esau, 2008 ; Lennox et Behlke, 2011 ; Oh, Ju et Park, 2009). Les éponges à miARNs sont des transcrits qui contiennent de multiples sites de liaison à un miARN d'intérêt à l'intérieur d'un ARN non codant ou dans le segment 3'-UTR d'un gène rapporteur (Reichel, Li et Millar, 2011). Ces transcrits sont généralement sous le contrôle d'un promoteur fort afin de produire de grandes quantités de transcrit : les éponges compétitionnent alors avec les cibles endogènes pour la liaison au miARN. Lorsqu'une éponge est exprimée à de hauts niveaux, en plus d'inhiber l'action du miARN d'intérêt, elle inhibe également l'action des miARNs qui sont membres de la même famille de miARNs, éliminant ainsi le problème de redondance fonctionnelle (Ebert et Sharp, 2010b). Cette approche devrait ainsi nous permettre d'obtenir un phénotype robuste chez les CT exprimant la construction. De plus, il est connu que les membres d'une même famille de miARNs régulent l'expression d'un même gène ou encore de gènes impliqués à différents niveaux dans le même processus cellulaire (Ebert, Neilson et Sharp, 2007). Par conséquent, la méthode d'éponges à miARNs devrait de surcroît nous permettre de mettre en évidence les réseaux impliqués dans la différenciation morphologique des CT. Enfin, quoique peu connues, les éponges à miARNs sont des outils versatiles et leur efficacité a été confirmée par de nombreux auteurs (Ebert et Sharp, 2010b ; Kluiver *et al.*, 2012a ; Kluiver *et al.*, 2012b). Ces inhibiteurs compétitifs ont d'ailleurs été récemment découverts dans différents systèmes, notamment chez les plantes et les mammifères (Ebert et Sharp, 2010a).

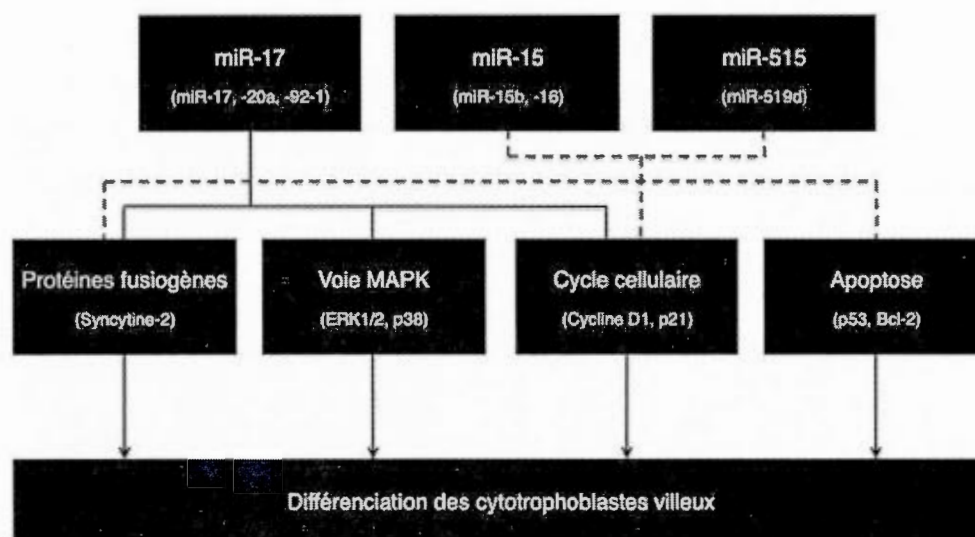


Figure 4.1 Schéma récapitulatif présentant les pistes de recherche discutées lors de cette étude.

Les familles de miARNs (miR-17,-15 et -515) pourraient avoir une influence sur la différenciation des CT villosités par la régulation d'une multitude de processus cellulaires. Les miARNs d'intérêt membres de ces familles ainsi que leur(s) cible(s) putative(s) sont représentés entre parenthèses.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusions

Notre étude avait pour but de démontrer l'implication des miARNs dans la régulation de la différenciation des trophoblastes humains *in vitro*. Afin d'y parvenir, une approche fonctionnelle reposant sur l'inhibition de l'enzyme Drosha a d'abord été mise au point. Contrairement à l'enzyme Dicer qui participe à la biosynthèse de plusieurs classes de sncARNs, Drosha n'est impliquée que dans la biosynthèse des miARNs.

L'inhibition de la biosynthèse *de novo* des miARNs a eu pour conséquence de stimuler la différenciation morphologique des cellules BeWo. Ainsi, les miARNs semblent être des régulateurs négatifs de la différenciation cellulaire et maintiendraient les CT dans un état non différencié. Il a été avancé qu'ils pourraient intervenir de manière précoce dans la régulation du processus de fusion en régulant la progression du cycle cellulaire, l'activation de la voie de signalisation des MAPK ou encore la progression de l'apoptose prenant place chez les CT destinés à fusionner avec le ST. Cependant, nous avons découvert que l'augmentation de la fusion cellulaire mesurée était accompagnée d'une augmentation de l'expression du transcrit de Syncytine-2. Cette glycoprotéine d'origine rétrovirale joue un rôle crucial dans le processus de fusion induite par la forskoline. Puisqu'il a été démontré qu'un nombre important de miARNs cible les séquences rétrovirales endogènes, cette découverte constitue une piste de recherche très intéressante.

À cet effet, des analyses *in silico* ont permis de révéler que l'expression du transcrit de Syncytine-2 pourrait être régulée par plusieurs membres des familles miR-17, miR-515 et miR-15. Cette découverte est très prometteuse puisque qu'il a été rapporté par Tong (2009) que l'expression de deux membres de la famille miR-17 varie en réponse au traitement à la

forskoline. En plus de considérer l'arrangement des gènes codant pour les miARNs d'intérêt, nous avons choisi au cours de cette étude de rassembler en familles les miARNs candidats. Cette approche hétérodoxe a permis de proposer une dynamique dans laquelle plusieurs miARNs inhibent à la fois l'expression du transcrit d'intérêt et d'adresser le concept de redondance fonctionnelle. Malgré qu'ils aient été soulignés par quelques auteurs, ces concepts n'avaient encore jamais été abordés de manière aussi explicite lors d'une étude sur la fonction des miARNs (Ulitsky, Laurent et Shamir, 2010). La méthode « éponges à miARNs » envisagée afin de poursuivre cette étude constitue enfin une approche novatrice qui permettrait d'observer l'effet de l'inhibition de plusieurs miARNs à la fois sur un même transcrit. Il est nécessaire de franchir cette nouvelle étape dans le présent domaine de recherche afin de recréer davantage les conditions endogènes de l'activité des miARNs.

En conclusion, cette étude s'est penchée pour la première fois sur la participation des miARNs dans la régulation de la différenciation morphologique des cellules BeWo *in vitro*. Elle a permis de mettre de l'avant plusieurs pistes de recherche afin de découvrir les mécanismes moléculaires exacts par lesquels les miARNs participent à la régulation de la fusion cellulaire prenant place chez les CT.

5.2 Perspectives

Des progrès importants ont été réalisés dans le domaine de recherche des fonctions des miARNs placentaires dans les dernières années, notamment dans la régulation de l'angiogenèse dans le contexte de placentas de grossesses compliquées par la PE. Ces progrès rapides font présager de nombreuses découvertes alors que les études de transcriptome réalisées peinent à faire entrevoir la lumière aux chercheurs. L'étude de la fonction des miARNs placentaires est donc extrêmement pertinente. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la fusion cellulaire pourrait permettre d'ajouter à notre compréhension de ce phénomène complexe ainsi qu'à la pathophysiologie des complications de grossesses idiopathiques communes.

APPENDICE A

CLASSIFICATION DES ARNS NON CODANTS

Les ARN non codants sont classés selon : leur longueur, leur processus de biogenèse, leur polarité et leurs fonctions putatives.

Tableau A.1 Classification sommaire des ARNs non codants (ncARNs).

ncARNs*	
<u>Long ARNs non codants (lncARNs)</u>	<u>Petits ARNs non codants (sncARNs)</u>
<ul style="list-style-type: none">- 200 – 100 000 nucléotides- Transcrits par pol II- Peu ou pas de maturation- Rétention nucléaire- Fonctions :<ul style="list-style-type: none">- Inactivation en cis- Régulation des gènes HOX via le recrutement des complexes modifiant les histones.	<p>Divisés en 2 classes :</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>Petits ARNs de ménage</i><ul style="list-style-type: none">- ARNs de transfert (ARNt)- ARNs ribosomiques (ARNr)- petits ARNs nucléolaires (snoARN) <p>Sans fonction régulatrice connue</p> <ul style="list-style-type: none">- <i>Petits ARNs régulateurs</i>

Tableau A.2 Classification sommaire des petits ARNs régulateurs

Petits ARNs régulateurs	
<u>ARNs agissant en cis</u>	<u>ARNs agissant en trans</u>
<i>siARN</i> (21-25 nt) <ul style="list-style-type: none"> - Dérivés d'ARN double-brin (ARNdb) exogène - Biosynthèse Drosha-indépendante - Interaction avec les protéines effectrices AGO - Défense contre ARNdb 	<i>piwiARN</i> (25-30 nt) <ul style="list-style-type: none"> - Biogenèse Dicer-indépendante - Interaction avec les protéines effectrices PIWI - Expression restreinte aux cellules germinales - Homologie importante avec transposons et autres éléments répétitifs
<i>endo-siARN</i> (21-25 nt) <ul style="list-style-type: none"> - Transcrits de séquences endogènes : séquences répétées, pseudogènes, transcrits antisens naturels (NAT), éléments transposons. - Inhibent expression transcrit sens (dégradation, modification de la structure de la chromatine). - Interaction avec les protéines effectrices AGO 	<i>microARN</i> (20-22 nt) <ul style="list-style-type: none">

A.1 Références

- Brosnan, C. A., et O. Voinnet. 2009. «The long and the short of noncoding RNAs». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 21, no 3, p. 416-425.
- Li, Z., et T. M. Rana. 2012. «Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries». *Acc Chem Res*, vol. 45, no 7, p. 1122-1131.
- Storz, G., S. Altuvia et K. M. Wassarman. 2005. «An abundance of RNA regulators». *Annu Rev Biochem*, vol. 74, p. 199-217.

APPENDICE B

SYSTÈME D'ANNOTATION DES MICROARNS

Le système d'annotation des miARNs utilisé dans ce mémoire est celui employé par la base de données miRBase (www.mirbase.org), tiré de l'ouvrage court « *A Uniform System for MicroRNA Annotation* » de Ambros *et al.* (2003).

B.1 Numérotation

La numérotation des gènes de miARN est simplement séquentielle. Par exemple, si la dernière séquence publiée chez la souris est nommée miR-5123, la prochaine séquence découverte sera nommée miR-5124.

B.2 Organisme, gène, précurseur et séquence mature

Les miARNs répertoriés dans la base de données miRBase sont désignés sous la forme hsa-mir-121. Les trois premières lettres désignent l'organisme (hsa : *homo sapiens sapiens*). Dans la littérature et dans la base de données miRBase, le miARN mature est désigné miR-121, alors que mir-121 réfère plutôt au gène de miARN et à la portion tige-boucle du transcrit primaire. Des séquences précurseurs et *loci* génomiques distincts qui expriment des séquences matures identiques seront nommés sous la forme hsa-mir-121-1 et hsa-mir-121-2. Des lettres en suffixe dénotent des séquences matures étroitement apparentées. Par exemple, hsa-miR-121a et hsa-miR-121b seraient dérivés des précurseurs hsa-mir-121a et hsa-mir-121b.

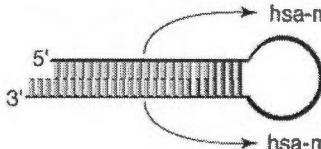
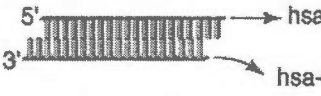


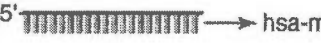

B.3 Espèces de miARNs

Des études de clonage identifient souvent deux séquences de miARNs qui sont exprimés à partir du même précurseur. Quand l'abondance relative de chacune des séquences indique clairement quel est le miARN prédominant, les séquences matures sont désignées miR-121 (produit prédominant) et miR-121* (produit du bras opposé du précurseur). Lorsque les données sont insuffisantes afin de déterminer laquelle des séquences est la plus fortement exprimée, les séquences sont nommées miR-121-5p (produit du bras 5' du précurseur) et miR-121-3p (bras 3').

B.4 Numéro d'accèsion

En plus d'un nom ou ID, chaque séquence présente dans la base de donnée miRBase a un numéro d'accèsion unique. Contrairement au nom des miARNs qui peuvent changer suite à de nouvelles découvertes, ce numéro demeure inchangé.

Tableau B.1 Illustration des suffixes employés dans la nomenclature de miARNs.

Suffixes	Exemple
5p & 3p	
*	
Numérotation	 
Lettres	 

Illustrations tirées de Luense, Carletti et Christenson, 2009

B.5 Références

- Ambros, V., B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun et T. Tuschl. 2003. «A uniform system for microRNA annotation». *RNA*, vol. 9, no 3, p. 277-279.
- Luense, L. J., M. Z. Carletti et L. K. Christenson. 2009. «Role of Dicer in female fertility». *Trends Endocrinol Metab*, vol. 20, no 6, p. 265-272.

miRBase: the microRNA database

Griffiths-Jones, S. 2004. «The microRNA Registry». *Nucleic Acids Res*, vol. 32, no Database issue, p. D109-111.

Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman et A. J. Enright. 2006. «miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature». *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no Database issue, p. D140-144.

Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, S. van Dongen et A. J. Enright. 2008. «miRBase: tools for microRNA genomics». *Nucleic Acids Res*, vol. 36, no Database issue, p. D154-158.

Kozomara, A., et S. Griffiths-Jones. 2011. «miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data». *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no Database issue, p. D152-157.

APPENDICE C

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Tableau C.1 Effet de la déplétion globale des miARNs sur la progression du cycle cellulaire dans les cellules BeWo.

La proportion de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytofluorométrie en flux 72h suivant la transfection d'un siARN spécifique (siARN1/2) ou témoin (siARNc) dans les cellules BeWo. Les données présentées sont le résultat d'une seule expérience indépendante (n=1).

Traitement	Témoin (%)	siARNc (%)	siARN1 (%)	siARN2 (%)
G ₀ , G ₁	28,84	34,45	30,22	24,66
S	62,84	54,17	69,66	73,95
G ₂ , M	8,33	11,39	0,11	1,39

L'inhibition de la synthèse *de novo* des miARNs s'est traduite par une accumulation des cellules BeWo en phase S. Une diminution du pourcentage de cellules en phases G₂ et M a conséquemment été mesurée tant pour siARN1 que siARN2.

C.1 Méthodologie

Des cellules de la lignée BeWo ont été mises en culture à une densité de 3×10^5 cellules/puits en plaques de 24 puits. Les cellules ont été transfectées par l'ajout de 37,5 ng de siARN ciblant Drosha complexé avec 3 μ l de HiPerfect dans chaque puits. Les transfections ont été effectuées en triplicata. 72h suivant la mise en culture, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS puis incubées en présence de trypsine-EDTA (0,05%

Trypsin ; 0.53 mM EDTA) (Wisent, cat. 325-042-CL) pendant 2 min sous agitation à 37°C. Pour chacun des traitements, les volumes de suspension cellulaire ont été combinés et un volume (1 : 1) de PBS a par la suite été ajouté. Les cellules ont été centrifugées à 2500 rpm pendant 5 min. Elles ont ensuite été resuspendues dans du PBS froid puis fixées par l'ajout d'une solution d'éthanol 70% froide (25 : 1). Les suspensions cellulaires ont ensuite été incubées à -20°C durant 48h. Par la suite, les cellules ont été centrifugées à 1000 rpm durant 5 min puis ont été resuspendues dans une solution de PBS contenant du PI (50 µg/ml) et de la RNase A (50 µg/ml). Enfin, la proportion de la population cellulaire dans chacune des phases du cycle cellulaire a été déterminée en analysant le contenu cellulaire en ADN en utilisant un cytofluoromètre en flux *FACS Calibur* (Becton Dickinson) équipé du logiciel CellQuest Pro (BD Biosciences).

BIBLIOGRAPHIE

- Akama, T., M. Sue, A. Kawashima, H. Wu, K. Tanigawa, S. Suzuki, M. Hayashi, A. Yoshihara, Y. Ishido, N. Ishii et K. Suzuki. 2012. «Identification of microRNAs that mediate thyroid cell growth induced by TSH». *Mol Endocrinol*, vol. 26, no 3, p. 493-501.
- Al-Khan, A., I. L. Aye, I. Barsoum, A. Borbely, E. Cebal, G. Cerchi, V. L. Clifton, S. Collins, T. Cotechini, A. Davey, J. Flores-Martin, T. Fournier, A. M. Franchi, R. E. Fretes, C. H. Graham, G. Godbole, S. R. Hansson, P. L. Headley, C. Ibarra, A. Jawerbaum, U. Kemmerling, Y. Kudo, P. K. Lala, L. Lassance, R. M. Lewis, E. Menkhorst, C. Morris, T. Nobuzane, G. Ramos, N. Rote, R. Saffery, C. Salafia, D. Sarr, H. Schneider, C. Sibley, A. T. Singh, T. S. Sivasubramaniyam, M. J. Soares, O. Vaughan, S. Zamudio et G. E. Lash. 2011. «IFPA Meeting 2010 Workshops Report II: Placental pathology; trophoblast invasion; fetal sex; parasites and the placenta; decidua and embryonic or fetal loss; trophoblast differentiation and syncytialisation». *Placenta*, vol. 32 Suppl 2, p. S90-99.
- Alsat, E., A. Malassiné, A. Tarrade, P. Merviel et D. Evain-Brion. 1999. «Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste». *Médecine Sciences*, vol. 15, no 11, p. 1236-1243.
- Aplin, J. D. 2010. «Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems». *Int J Dev Biol*, vol. 54, no 2-3, p. 323-329.
- Armant, D. R. 2005. «Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells». *Dev Biol*, vol. 280, no 2, p. 260-280.
- Askelund, K. J., et L. W. Chamley. 2011. «Trophoblast deportation part I: review of the evidence demonstrating trophoblast shedding and deportation during human pregnancy». *Placenta*, vol. 32, no 10, p. 716-723.
- Askelund, K. J., L. W. Chamley et P. Pantham. 2011. «Trophoblast deportation part II: a review of the maternal consequences of trophoblast deportation.». *Placenta*, vol. 32, no 10, p. 724-731.
- Baczyk, D., S. Drewlo, L. Proctor, C. Dunk, S. Lye et J. Kingdom. 2009. «Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast». *Cell Death Differ*, vol. 16, no 5, p. 719-727.
- Baek, D., J. Villen, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi et D. P. Bartel. 2008. «The impact of microRNAs on protein output». *Nature*, vol. 455, no 7209, p. 64-71.
- Baergen, R. N. 2011a. «Chorionic Villi: Histology and Villous Development». In *Manual of Pathology of the Human Placenta*, 2nd, Springer, p. 69-83. New York.

- Baergen, R. N. 2011b. «Early Placental Development». In *Manual of Pathology of the Human Placenta*, 2nd, Springer, p. 59-68. New York.
- Bandiera, S., E. Hatem, S. Lyonnet et A. Henrion-Caude. 2010. «microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes». *Clin Genet*, vol. 77, no 4, p. 306-313.
- Bartel, D. P. 2009. «MicroRNAs: target recognition and regulatory functions». *Cell*, vol. 136, no 2, p. 215-233.
- Benirschke, K., et L. Willes. 2010. «Deportation of trophoblastic emboli to maternal lung: A source of cell-free DNA in maternal blood?». *Chimerism*, vol. 1, no 1, p. 15-18.
- Benirschke, K., G. J. Burton et R. N. Baergen. 2012a. «Basic Structure of the Villous Trees». In *Pathology of the human placenta*, 6th, Springer, p. 55-100. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Benirschke, K., G. J. Burton et R. N. Baergen. 2012b. «Early Development of the Human Placenta». In *Pathology of the human placenta*, 6th, Springer, p. 41-53. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Benirschke, K., G. J. Burton et R. N. Baergen. 2012c. «Nonvillous Parts and Trophoblast Invasion». In *Pathology of the human placenta*, 6th, Springer, p. 157-240. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Benirschke, K., G. J. Burton et R. N. Baergen. 2012d. «Transplacental Hemorrhage, Cell Transfer, Trauma». In *Pathology of the human placenta*, 6th, Springer, p. 461-485. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Benirschke, Kurt, Peter Kaufmann, Rebecca Baergen, M. Castellucci et P. Kaufmann. 2006. «Basic Structure of the Villous Trees». In *Pathology of the human placenta*, Springer, p. 50-120.
- Betel, D., A. Koppal, P. Agius, C. Sander et C. Leslie. 2010. «Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites». *Genome Biol*, vol. 11, no 8, p. R90.
- Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D. S. Marks et C. Sander. 2008. «The microRNA.org resource: targets and expression». *Nucleic Acids Res*, vol. 36, no Database issue, p. D149-153.
- Bjerregaard, B., S. Holck, I. J. Christensen et L. I. Larsson. 2006. «Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions». *Cell Mol Life Sci*, vol. 63, no 16, p. 1906-1911.
- Blond, J. L., D. Lavillette, V. Cheynet, O. Bouton, G. Oriol, S. Chapel-Fernandes, B. Mandrand, F. Mallet et F. L. Cosset. 2000. «An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor». *J Virol*, vol. 74, no 7, p. 3321-3329.

- Bu, Y., C. Lu, C. Bian, J. Wang, J. Li, B. Zhang, Z. Li, G. Brewer et R. C. Zhao. 2009. «Knockdown of Dicer in MCF-7 human breast carcinoma cells results in G1 arrest and increased sensitivity to cisplatin». *Oncol Rep*, vol. 21, no 1, p. 13-17.
- Burton, G. J. 2011. «Deportation of syncytial sprouts from the term human placenta». *Placenta*, vol. 32, no 1, p. 96-98.
- Burton, G. J., et C. J. Jones. 2009. «Syncytial knots, sprouts, apoptosis, and trophoblast deportation from the human placenta». *Taiwan J Obstet Gynecol*, vol. 48, no 1, p. 28-37.
- Bushati, N., et S. M. Cohen. 2007. «microRNA functions». *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 23, p. 175-205.
- Cai, X., C. H. Hagedorn et B. R. Cullen. 2004. «Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs». *RNA*, vol. 10, no 12, p. 1957-1966.
- Carthew, R. W., et E. J. Sontheimer. 2009. «Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs». *Cell*, vol. 136, no 4, p. 642-655.
- Chang, C. W., G. D. Chang et H. Chen. 2011. «A Novel Cyclic AMP/Epac1/CaMKI Signaling Cascade Promotes GCM1 Desumoylation and Placental Cell Fusion, ñ». *Mol Cell Biol*, vol. 31, no 18, p. 3820-3831.
- Chang, C. W., H. C. Chuang, C. Yu, T. P. Yao et H. Chen. 2005. «Stimulation of GCMA transcriptional activity by cyclic AMP/protein kinase A signaling is attributed to CBP-mediated acetylation of GCMA». *Mol Cell Biol*, vol. 25, no 19, p. 8401-8414.
- Chang, M., D. Mukherjea, R. M. Gobble, K. A. Groesch, R. J. Torry et D. S. Torry. 2008. «Glial cell missing 1 regulates placental growth factor (PGF) gene transcription in human trophoblast». *Biol Reprod*, vol. 78, no 5, p. 841-851.
- Chao, A., C. L. Tsai, P. C. Wei, S. Hsueh, A. S. Chao, C. J. Wang, C. N. Tsai, Y. S. Lee, T. H. Wang et C. H. Lai. 2010. «Decreased expression of microRNA-199b increases protein levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma». *Cancer Lett*, vol. 291, no 1, p. 99-107.
- Chekulaeva, M., et W. Filipowicz. 2009. «Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 21, no 3, p. 452-460.
- Chen, Y. X., M. Allars, K. Maiti, G. L. Angeli, C. Abou-Seif, R. Smith et R. C. Nicholson. 2011. «Factors affecting cytotrophoblast cell viability and differentiation: Evidence of a link between syncytialisation and apoptosis». *Int J Biochem Cell Biol*.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura et R. Shiekhattar. 2005. «TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing». *Nature*, vol. 436, no 7051, p. 740-744.
- Cheng, C., N. Bhardwaj et M. Gerstein. 2009. «The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs». *BMC Genomics*, vol. 10, p. 431.

- Chiang, M. H., F. Y. Liang, C. P. Chen, C. W. Chang, M. L. Cheong, L. J. Wang, C. Y. Liang, F. Y. Lin, C. C. Chou et H. Chen. 2009. «Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia». *J Biol Chem*, vol. 284, no 26, p. 17411-17419.
- Chim, S. S., T. K. Shing, E. C. Hung, T. Y. Leung, T. K. Lau, R. W. Chiu et Y. M. Lo. 2008. «Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma». *Clin Chem*, vol. 54, no 3, p. 482-490.
- Chuang, H. C., C. W. Chang, G. D. Chang, T. P. Yao et H. Chen. 2006. «Histone deacetylase 3 binds to and regulates the GCMA transcription factor». *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no 5, p. 1459-1469.
- Cleal, J. K., P. Day, M. A. Hanson et R. M. Lewis. 2009. «Measurement of housekeeping genes in human placenta». *Placenta*, vol. 30, no 11, p. 1002-1003.
- Cloonan, N., M. K. Brown, A. L. Steptoe, S. Wani, W. L. Chan, A. R. Forrest, G. Kolle, B. Gabrielli et S. M. Grimmond. 2008. «The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition». *Genome Biol*, vol. 9, no 8, p. R127.
- Colbern, G. T., M. H. Chiang et E. K. Main. 1994. «Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta». *Am J Obstet Gynecol*, vol. 170, no 5 Pt 1, p. 1244-1250.
- Concepcion, C. P., C. Bonetti et A. Ventura. 2012. «The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease». *Cancer J*, vol. 18, no 3, p. 262-267.
- Cronier, L., J. L. Frendo, N. Defamie, G. Pidoux, G. Bertin, J. Guibourdenche, G. Pointis et A. Malassine. 2003. «Requirement of gap junctional intercellular communication for human villous trophoblast differentiation». *Biol Reprod*, vol. 69, no 5, p. 1472-1480.
- Curtis, H. J., C. R. Sibley et M. J. Wood. 2012. «Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA». *Wiley Interdiscip Rev RNA*, vol. 3, no 5, p. 617-632.
- Daoud, G., M. Amyot, E. Rassart, A. Masse, L. Simoneau et J. Lafond. 2005. «ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta». *J Physiol*, vol. 566, no Pt 2, p. 409-423.
- Das, M., B. Xu, L. Lin, S. Chakrabarti, V. Shivaswamy et N. S. Rote. 2004. «Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWo model of human villous cytotrophoblast». *Placenta*, vol. 25, no 5, p. 396-407.
- Davis-Dusenbery, B. N., et A. Hata. 2010. «Mechanisms of control of microRNA biogenesis». *J Biochem*, vol. 148, no 4, p. 381-392.
- Delidaki, M., M. Gu, A. Hein, M. Vatish et D. K. Grammatopoulos. 2011. «Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line». *Mol Cell Endocrinol*, vol. 332, no 1-2, p. 213-220.

- Deshpande, A., A. Pastore, A. J. Deshpande, Y. Zimmermann, G. Hutter, M. Weinkauff, C. Buske, W. Hiddemann et M. Dreyling. 2009. «3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene». *Cell Cycle*, vol. 8, no 21, p. 3584-3592.
- Dong, Y., L. Zhang, S. Zhang, Y. Bai, H. Chen, X. Sun, W. Yong, W. Li, S. C. Colvin, S. J. Rhodes, W. Shou et Z. Y. Zhang. 2012. «Phosphatase of regenerating liver 2 (PRL2) is essential for placental development by down-regulating PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10) and activating Akt protein». *J Biol Chem*, vol. 287, no 38, p. 32172-32179.
- Donker, R. B., J. F. Mouillet, D. M. Nelson et Y. Sadovsky. 2007. «The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts». *Mol Hum Reprod*, vol. 13, no 4, p. 273-279.
- Donker, R. B., J. F. Mouillet, T. Chu, C. A. Hubel, D. B. Stolz, A. E. Morelli et Y. Sadovsky. 2012. «The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes». *Mol Hum Reprod*.
- Dunk, C. E., A. Gellhaus, S. Drewlo, D. Baczyk, A. J. Potgens, E. Winterhager, J. C. Kingdom et S. J. Lye. 2012. «The molecular role of connexin 43 in human trophoblast cell fusion». *Biol Reprod*, vol. 86, no 4, p. 115.
- Ebert, M. S., et P. A. Sharp. 2010a. «Emerging roles for natural microRNA sponges». *Curr Biol*, vol. 20, no 19, p. R858-861.
- Ebert, M. S., et P. A. Sharp. 2010b. «MicroRNA sponges: progress and possibilities». *RNA*, vol. 16, no 11, p. 2043-2050.
- Ebert, M. S., J. R. Neilson et P. A. Sharp. 2007. «MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells». *Nat Methods*, vol. 4, no 9, p. 721-726.
- Enquobahrie, D. A., D. F. Abetew, T. K. Sorensen, D. Willoughby, K. Chidambaram et M. A. Williams. 2010. «Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia». *Am J Obstet Gynecol*.
- Enright, A. J., B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander et D. S. Marks. 2003. «MicroRNA targets in Drosophila». *Genome Biol*, vol. 5, no 1, p. R1.
- Esau, C. C. 2008. «Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides». *Methods*, vol. 44, no 1, p. 55-60.
- Esnault, C., S. Priet, D. Ribet, C. Vernochet, T. Bruls, C. Lavialle, J. Weissenbach et T. Heidmann. 2008. «A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no 45, p. 17532-17537.
- Evain-Brion, D. 2001. «[The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]». *Gynecol Obstet Fertil*, vol. 29, no 7-8, p. 497-502.
- Fazi, F., et C. Nervi. 2008. «MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination». *Cardiovasc Res*, vol. 79, no 4, p. 553-561.

- Fogarty, N. M., T. M. Mayhew, A. C. Ferguson-Smith et G. J. Burton. 2011. «A quantitative analysis of transcriptionally active syncytiotrophoblast nuclei across human gestation». *J Anat*, vol. 219, no 5, p. 601-610.
- Forbes, K., F. Farrokhnia, J. D. Aplin et M. Westwood. 2012. «Dicer-dependent miRNAs provide an endogenous restraint on cytotrophoblast proliferation». *Placenta*, vol. 33, no 7, p. 581-585.
- Fornari, F., M. Milazzo, P. Chieco, M. Negrini, E. Marasco, G. Capranico, V. Mantovani, J. Marinello, S. Sabbioni, E. Callegari, M. Cescon, M. Ravaioli, C. M. Croce, L. Bolondi et L. Gramantieri. 2012. «In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2». *J Pathol*, vol. 227, no 3, p. 275-285.
- Frendo, J. L., D. Olivier, V. Cheynet, J. L. Blond, O. Bouton, M. Vidaud, M. Rabreau, D. Evain-Brion et F. Mallet. 2003b. «Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation». *Mol Cell Biol*, vol. 23, no 10, p. 3566-3574.
- Frendo, J. L., L. Cronier, G. Bertin, J. Guibourdenche, M. Vidaud, D. Evain-Brion et A. Malassine. 2003a. «Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation». *J Cell Sci*, vol. 116, no Pt 16, p. 3413-3421.
- Friedman, J. M., et P. A. Jones. 2009. «MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease». *Swiss Med Wkly*, vol. 139, no 33-34, p. 466-472.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge et D. P. Bartel. 2009. «Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs». *Genome Res*, vol. 19, no 1, p. 92-105.
- Garcia, D. M., D. Baek, C. Shin, G. W. Bell, A. Grimson et D. P. Bartel. 2011. «Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs». *Nat Struct Mol Biol*, vol. 18, no 10, p. 1139-1146.
- Gauster, M., et B. Huppertz. 2010. «The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion». *Placenta*, vol. 31, no 2, p. 82-88.
- Gauster, M., G. Moser, K. Orendi et B. Huppertz. 2009. «Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia». *Placenta*, vol. 30 Suppl A, p. S49-54.
- Gauster, M., M. Siwetz et B. Huppertz. 2009. «Fusion of villous trophoblast can be visualized by localizing active caspase 8». *Placenta*, vol. 30, no 6, p. 547-550.
- Ge, Y., S. Pan, D. Guan, H. Yin, Y. Fan, J. Liu, S. Zhang, H. Zhang, L. Feng, Y. Wang, R. Xu et J. Q. Yin. 2013. «MicroRNA-350 induces pathological heart hypertrophy by repressing both p38 and JNK pathways». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1832, no 1, p. 1-10.
- Gilad, S., E. Meiri, Y. Yogev, S. Benjamin, D. Lebanony, N. Yerushalmi, H. Benjamin, M. Kushnir, H. Cholkh, N. Melamed, Z. Bentwich, M. Hod, Y. Goren et A. Chajut. 2008. «Serum microRNAs are promising novel biomarkers». *PLoS One*, vol. 3, no 9, p. e3148.

- Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim et D. P. Bartel. 2007. «MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing». *Mol Cell*, vol. 27, no 1, p. 91-105.
- Guilbert, L. J., M. Riddell et B. Winkler-Lowen. 2010. «Caspase activation is not required for villous cytotrophoblast fusion into syncytiotrophoblasts». *Placenta*, vol. 31, no 11, p. 982-988.
- Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman et D. P. Bartel. 2010. «Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels». *Nature*, vol. 466, no 7308, p. 835-840.
- Guo, L., H. Li, T. Liang, J. Lu, Q. Yang, Q. Ge et Z. Lu. 2012. «Consistent isomiR expression patterns and 3' addition events in miRNA gene clusters and families implicate functional and evolutionary relationships». *Mol Biol Rep*.
- Hakim, S. T., M. Alsayari, D. C. McLean, S. Saleem, K. C. Addanki, M. Aggarwal, K. Mahalingam et O. Bagasra. 2008. «A large number of the human microRNAs target lentiviruses, retroviruses, and endogenous retroviruses». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 369, no 2, p. 357-362.
- Handwerger, S. 2010. «New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation». *Mol Cell Endocrinol*, vol. 323, no 1, p. 94-104.
- Haslinger, P., S. Haider, S. Sonderegger, J. V. Otten, J. Pollheimer, G. Whitley et M. Knofler. 2013. «AKT Isoforms 1 and 3 Regulate Basal and Epidermal Growth Factor-Stimulated SGHPL-5 Trophoblast Cell Migration in Humans». *Biol Reprod*.
- Hayward, M. D., A. J. Potgens, S. Drewlo, P. Kaufmann et J. E. Rasko. 2007. «Distribution of human endogenous retrovirus type W receptor in normal human villous placenta». *Pathology*, vol. 39, no 4, p. 406-412.
- Heazell, A. E., et I. P. Crocker. 2008. «Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies». *Placenta*, vol. 29, no 9, p. 772-783.
- Herr, F., N. Baal, R. Widmer-Teske, T. McKinnon et M. Zygmunt. 2010. «How to study placental vascular development?». *Theriogenology*, vol. 73, no 6, p. 817-827.
- Herranz, H., et S. M. Cohen. 2010. «MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems». *Genes Dev*, vol. 24, no 13, p. 1339-1344.
- Holder, B. S., C. L. Tower, K. Forbes, M. J. Mulla, J. D. Aplin et V. M. Abrahams. 2012b. «Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1». *Immunology*, vol. 136, no 2, p. 184-191.
- Holder, B. S., C. L. Tower, V. M. Abrahams et J. D. Aplin. 2012a. «Syncytin 1 in the human placenta». *Placenta*.
- Hon, L. S., et Z. Zhang. 2007. «The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression». *Genome Biol*, vol. 8, no 8, p. R166.

- Hromadnikova, I., K. Kotlabova, J. Doucha et K. Dlouha. 2012. «Absolute and Relative Quantification of Placenta-Specific MicroRNAs in Maternal Circulation with Placental Insufficiency-Related Complications». *J Mol Diagn*.
- Hu, Y., P. Li, S. Hao, L. Liu, J. Zhao et Y. Hou. 2009. «Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia». *Clin Chem Lab Med*, vol. 47, no 8, p. 923-929.
- Huang, Y., Q. Zou, H. Song, F. Song, L. Wang, G. Zhang et X. Shen. 2010. «A study of miRNAs targets prediction and experimental validation». *Protein Cell*, vol. 1, no 11, p. 979-986.
- Huppertz, B. 2006. «Placental Villous Trophoblast: the Altered Balance Between Proliferation and Apoptosis Triggers Pre-eclampsia». *J Reproduktionsmed Endokrinol*, vol. 3, no 2, p. 103-108.
- Huppertz, B. 2008. «Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis». *Hypertension*, vol. 51, no 4, p. 970-975.
- Huppertz, B., C. Bartz et M. Kokozidou. 2006. «Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion». *Micron*, vol. 37, no 6, p. 509-517.
- Huppertz, B., et M. Gauster. 2011. «Trophoblast fusion». *Adv Exp Med Biol*, vol. 713, p. 81-95.
- Ishibashi, O., A. Ohkuchi, M. M. Ali, R. Kurashina, S. S. Luo, T. Ishikawa, T. Takizawa, C. Hirashima, K. Takahashi, M. Migita, G. Ishikawa, K. Yoneyama, H. Asakura, A. Izumi, S. Matsubara et T. Takeshita. 2012. «Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia». *Hypertension*, vol. 59, no 2, p. 265-273.
- Ivey, K. N., et D. Srivastava. 2010. «MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions». *Cell Stem Cell*, vol. 7, no 1, p. 36-41.
- James, J. L., A. M. Carter et L. W. Chamley. 2012. «Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation?». *Placenta*, vol. 33, no 5, p. 327-334.
- James, J. L., P. R. Stone et L. W. Chamley. 2006. «The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy». *Hum Reprod Update*, vol. 12, no 2, p. 137-144.
- Ji, L., J. Brkic, M. Liu, G. Fu, C. Peng et Y. L. Wang. 2012. «Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia». *Mol Aspects Med*.
- John, B., A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander et D. S. Marks. 2004. «Human MicroRNA targets». *PLoS Biol*, vol. 2, no 11, p. e363.

- John, R., et M. Hemberger. 2012. «A placenta for life». *Reprod Biomed Online*, vol. 25, no 1, p. 5-11.
- Johnstone, E. D., C. P. Sibley, B. Lowen et L. J. Guilbert. 2005. «Epidermal growth factor stimulation of trophoblast differentiation requires MAPK11/14 (p38 MAP kinase) activation». *Biol Reprod*, vol. 73, no 6, p. 1282-1288.
- Juriscova, A., J. Detmar et I. Caniggia. 2005. «Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth». *Birth Defects Res C Embryo Today*, vol. 75, no 4, p. 262-280.
- Kai, Z. S., et A. E. Pasquinelli. 2010. «MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs». *Nat Struct Mol Biol*, vol. 17, no 1, p. 5-10.
- Kim, V. N. 2005. «MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, no 5, p. 376-385.
- Kingdom, J., B. Huppertz, G. Seaward et P. Kaufmann. 2000. «Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth». *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 92, no 1, p. 35-43.
- Kliver, J., I. Slezak-Prochazka, K. Smigielska-Czepiel, N. Halsema, B. J. Kroesen et A. van den Berg. 2012b. «Generation of miRNA sponge constructs». *Methods*.
- Kliver, J., J. H. Gibcus, C. Hettinga, A. Adema, M. K. Richter, N. Halsema, I. Slezak-Prochazka, Y. Ding, B. J. Kroesen et A. van den Berg. 2012a. «Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition». *PLoS One*, vol. 7, no 1, p. e29275.
- Knofler, M., L. Saleh, S. Bauer, B. Galos, H. Rotheneder, P. Husslein et H. Helmer. 2004. «Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation». *Endocrinology*, vol. 145, no 4, p. 1685-1694.
- Kotlabova, K., J. Doucha et I. Hromadnikova. 2011. «Placental-specific microRNA in maternal circulation—identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential». *J Reprod Immunol*, vol. 89, no 2, p. 185-191.
- Krol, J., I. Loedige et W. Filipowicz. 2010. «The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay». *Nat Rev Genet*, vol. 11, no 9, p. 597-610.
- Krutzfeldt, J., S. Kuwajima, R. Braich, K. G. Rajeev, J. Pena, T. Tuschl, M. Manoharan et M. Stoffel. 2007. «Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs». *Nucleic Acids Res*, vol. 35, no 9, p. 2885-2892.
- Kuckenberger, P., C. Kubaczka et H. Schorle. 2012. «The role of transcription factor Tcfap2c/TFAP2C in trophoblast development». *Reprod Biomed Online*, vol. 25, no 1, p. 12-20.
- Kudo, Y., et C. A. Boyd. 2002. «Human placental amino acid transporter genes: expression and function». *Reproduction*, vol. 124, no 5, p. 593-600.

- Kuehbacher, A., C. Urbich, A. M. Zeiher et S. Dimmeler. 2007. «Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis». *Circ Res*, vol. 101, no 1, p. 59-68.
- Lafond, J., et L. Simoneau. 2006. «Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins». *Int Rev Cytol*, vol. 250, p. 109-174.
- Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R. U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H. I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan et T. Tuschl. 2007. «A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing». *Cell*, vol. 129, no 7, p. 1401-1414.
- Lang, A. B., B. F. Odermatt et J. R. Ruettner. 1986. «Monoclonal antibodies to human cytokeratins: application to various epithelial and mesothelial cells». *Exp Cell Biol*, vol. 54, no 2, p. 61-72.
- Lanoix D., J. St-Pierre, A. A. Lacasse, M. Viau, J. Lafond et C. Vaillancourt. 2012b. «Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark». *Placenta*, vol. 33, no 3, p. 151-156.
- Lanoix, D., A. A. Lacasse, J. St-Pierre, S. C. Taylor, M. Ethier-Chiasson, J. Lafond et C. Vaillancourt. 2012a. «Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta». *Mol Biotechnol*, vol. 52, no 3, p. 234-243.
- Lapaire, O., W. Holzgreve, J. C. Oosterwijk, R. Brinkhaus et D. W. Bianchi. 2007. «Georg Schmoll on trophoblasts in the maternal circulation». *Placenta*, vol. 28, no 1, p. 1-5.
- Larsson, L. I., B. Bjerregaard et J. F. Talts. 2008. «Cell fusions in mammals». *Histochem Cell Biol*, vol. 129, no 5, p. 551-561.
- Larsson, L. I., B. Bjerregaard, L. Wulf-Andersen et J. F. Talts. 2007. «Syncytin and cancer cell fusions». *ScientificWorldJournal*, vol. 7, p. 1193-1197.
- Larsson, L. I., S. Holck et I. J. Christensen. 2007. «Prognostic role of syncytin expression in breast cancer». *Hum Pathol*, vol. 38, no 5, p. 726-731.
- Lash, G. E., G. J. Burton, L. W. Chamley, V. L. Clifton, M. Constancia, I. P. Crocker, V. Dantzer, G. Desoye, S. Drewlo, D. G. Hemmings, S. Hiendleder, B. Kalionis, J. A. Keelan, Y. Kudo, R. M. Lewis, U. Manuelpillai, P. Murthi, D. Natale, C. Pfarrer, S. Robertson, R. Saffery, S. Saito, A. Sferruzzi-Perri, L. Sobrevia, B. J. Waddell et C. T. Roberts. 2010. «IFPA Meeting 2009 workshops report». *Placenta*, vol. 31 Suppl, p. S4-20.
- Lavillette, D., M. Marin, A. Ruggieri, F. Mallet, F. L. Cosset et D. Kabat. 2002. «The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors». *J Virol*, vol. 76, no 13, p. 6442-6452.

- Lee, I., S. S. Ajay, J. I. Yook, H. S. Kim, S. H. Hong, N. H. Kim, S. M. Dhanasekaran, A. M. Chinnaiyan et B. D. Athey. 2009. «New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites». *Genome Res*, vol. 19, no 7, p. 1175-1183.
- Lee, L. W., S. Zhang, A. Etheridge, L. Ma, D. Martin, D. Galas et K. Wang. 2010. «Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing». *RNA*, vol. 16, no 11, p. 2170-2180.
- Lennox, K. A., et M. A. Behlke. 2011. «Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides». *Gene Ther*, vol. 18, no 12, p. 1111-1120.
- Lewis, B. P., C. B. Burge et D. P. Bartel. 2005. «Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets». *Cell*, vol. 120, no 1, p. 15-20.
- Li, J., W. Xia, B. Huang, L. Chen, X. Su, S. Li, F. Wang, H. Ding et N. Shao. 2010. «A strategy to rapidly identify the functional targets of microRNAs by combining bioinformatics and mRNA cytoplasmic/nucleic ratios in culture cells». *FEBS Lett*, vol. 584, no 14, p. 3198-3202.
- Liang, C. Y., L. J. Wang, C. P. Chen, L. F. Chen, Y. H. Chen et H. Chen. 2010. «GCM1 regulation of the expression of syncytin 2 and its cognate receptor MFSD2A in human placenta». *Biol Reprod*, vol. 83, no 3, p. 387-395.
- Liang, Y., D. Ridzon, L. Wong et C. Chen. 2007. «Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues». *BMC Genomics*, vol. 8, p. 166.
- Lim, K., et H. I. Chang. 2010. «Elevated O-linked N-acetylglucosamine correlated with reduced Sp1 cooperative DNA binding with its collaborating factors *in vivo*». *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 74, no 8, p. 1668-1672.
- Lin, F. Y., C. W. Chang, M. L. Cheong, H. C. Chen, D. Y. Lee, G. D. Chang et H. Chen. 2011. «Dual-specificity phosphatase 23 mediates GCM1 dephosphorylation and activation». *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no 3, p. 848-861.
- Lindow, M. 2011. «Prediction of targets for microRNAs». *Methods Mol Biol*, vol. 703, p. 311-317.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz et T. R. Golub. 2005. «MicroRNA expression profiles classify human cancers». *Nature*, vol. 435, no 7043, p. 834-838.
- Luo, L., G. Ye, L. Nadeem, G. Fu, B. B. Yang, C. Dunk, S. Lye et C. Peng. 2012. «MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal». *J Cell Sci*.

- Luo, S. S., O. Ishibashi, G. Ishikawa, T. Ishikawa, A. Katayama, T. Mishima, T. Takizawa, T. Shigihara, T. Goto, A. Izumi, A. Ohkuchi, S. Matsubara et T. Takeshita. 2009. «Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes». *Biol Reprod*, vol. 81, no 4, p. 717-729.
- Maccani, M. A., J. F. Padbury et C. J. Marsit. 2011. «miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth». *PLoS One*, vol. 6, no 6, p. e21210.
- Maccani, M. A., M. Avissar-Whiting, C. E. Banister, B. McGonnigal, J. F. Padbury et C. J. Marsit. 2010. «Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21 and miR-146a in the placenta». *Epigenetics*, vol. 5, no 7.
- Malassine, A., J. L. Frendo et D. Evain-Brion. 2010. «Trisomy 21- affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation». *Int J Dev Biol*, vol. 54, no 2-3, p. 475-482.
- Malassine, A., J. L. Frendo, S. Blaise, K. Handschuh, P. Gerbaud, V. Tsatsaris, T. Heidmann et D. Evain-Brion. 2008. «Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta». *Retrovirology*, vol. 5, p. 6.
- Malassine, A., S. Blaise, K. Handschuh, H. Lalucque, A. Dupressoir, D. Evain-Brion et T. Heidmann. 2007. «Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells». *Placenta*, vol. 28, no 2-3, p. 185-191.
- Maltepe, E., A. I. Bakardjiev et S. J. Fisher. 2010. «The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development». *J Clin Invest*, vol. 120, no 4, p. 1016-1025.
- Manaster, I., D. Goldman-Wohl, C. Greenfield, D. Nachmani, P. Tsukerman, Y. Hamani, S. Yagel et O. Mandelboim. 2012. «MiRNA-Mediated Control of HLA-G Expression and Function». *PLoS One*, vol. 7, no 3, p. e33395.
- Mangeney, M., M. Renard, G. Schlecht-Louf, I. Bouallaga, O. Heidmann, C. Letzelter, A. Richaud, B. Ducos et T. Heidmann. 2007. «Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no 51, p. 20534-20539.
- Martinez, N. J., et R. I. Gregory. 2010. «MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity». *Cell Stem Cell*, vol. 7, no 1, p. 31-35.
- Marzioni, D., M. Banita, A. Felici, F. J. Paradinas, E. Newlands, M. De Nictolis, J. Muhlhauser et M. Castellucci. 2001. «Expression of ZO-1 and occludin in normal human placenta and in hydatidiform moles». *Mol Hum Reprod*, vol. 7, no 3, p. 279-285.
- Mayor-Lynn, K., T. Toloubeydokhti, A. C. Cruz et N. Chegini. 2010. «Expression Profile of MicroRNAs and mRNAs in Human Placentas From Pregnancies Complicated by Preeclampsia and Preterm Labor». *Reprod Sci*.

- Mendes, N. D., A. T. Freitas et M. F. Sagot. 2009. «Current tools for the identification of miRNA genes and their targets». *Nucleic Acids Res*, vol. 37, no 8, p. 2419-2433.
- Miura, K., S. Miura, K. Yamasaki, A. Higashijima, A. Kinoshita, K. Yoshiura et H. Masuzaki. 2010. «Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma». *Clin Chem*, vol. 56, no 11, p. 1767-1771.
- Miyazaki, Y., X. Sun, H. Uchida, J. Zhang et S. Nimer. 1996. «MEF, a novel transcription factor with an Elf-1 like DNA binding domain but distinct transcriptional activating properties». *Oncogene*, vol. 13, no 8, p. 1721-1729.
- Miyoshi, K., T. Miyoshi et H. Siomi. 2010. «Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production». *Mol Genet Genomics*, vol. 284, no 2, p. 95-103.
- Montenegro, D., R. Romero, B. L. Pineles, A. L. Tarca, Y. M. Kim, S. Draghici, J. P. Kusanovic, J. S. Kim, O. Erez, S. Mazaki-Tovi, S. Hassan, J. Espinoza et C. J. Kim. 2007. «Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes». *Am J Obstet Gynecol*, vol. 197, no 3, p. 289 e281-286.
- Montenegro, D., R. Romero, S. S. Kim, A. L. Tarca, S. Draghici, J. P. Kusanovic, J. S. Kim, D. C. Lee, O. Erez, F. Gotsch, S. S. Hassan et C. J. Kim. 2009. «Expression patterns of microRNAs in the chorioamniotic membranes: a role for microRNAs in human pregnancy and parturition». *J Pathol*, vol. 217, no 1, p. 113-121.
- Morales Prieto, D. M., et U. R. Markert. 2011. «MicroRNAs in pregnancy». *J Reprod Immunol*, vol. 88, no 2, p. 106-111.
- Morales-Prieto, D. M., E. Schleussner et U. R. Markert. 2011. «Reduction in miR-141 is induced by leukemia inhibitory factor and inhibits proliferation in choriocarcinoma cell line JEG-3». *Am J Reprod Immunol*, vol. 66 Suppl 1, p. 57-62.
- Morales-Prieto, D. M., W. Chaiwangyen, S. Ospina-Prieto, U. Schneider, J. Herrmann, B. Gruhn et U. R. Markert. 2012. «MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells». *Placenta*, vol. 33, no 9, p. 725-734.
- Mouillet, J. F., T. Chu et Y. Sadovsky. 2011. «Expression patterns of placental microRNAs». *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, vol. 91, no 8, p. 737-743.
- Mouillet, J. F., T. Chu, C. A. Hubel, D. M. Nelson, W. T. Parks et Y. Sadovsky. 2010. «The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction». *Placenta*, vol. 31, no 9, p. 781-784.
- Mounier, C., B. Barbeau, C. Vaillancourt et J. Lafond. 2009. «Endocrinology and cell signaling in human villous trophoblast». *Methods Mol Biol*, vol. 550, p. 89-102.
- Muljo, S. A., C. Kanellopoulou et L. Aravind. 2010. «MicroRNA targeting in mammalian genomes: genes and mechanisms». *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, vol. 2, no 2, p. 148-161.

- Muroi, Y., T. Sakurai, A. Hanashi, K. Kubota, K. Nagaoka et K. Imakawa. 2009. «CD9 regulates transcription factor GCM1 and ERVWE1 expression through the cAMP/protein kinase A signaling pathway». *Reproduction*, vol. 138, no 6, p. 945-951.
- Murthi, P., E. Fitzpatrick, A. J. Borg, S. Donath, S. P. Brennecke et B. Kalionis. 2008. «GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction». *Placenta*, vol. 29, no 9, p. 798-801.
- Myatt, L., et X. Cui. 2004. «Oxidative stress in the placenta». *Histochem Cell Biol*, vol. 122, no 4, p. 369-382.
- Newhouse, S. M., S. T. Davidge, B. Winkler-Lowen, N. Demianczuk et L. J. Guilbert. 2007. «*In vitro* differentiation of villous trophoblasts from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction with and without pre-eclampsia». *Placenta*, vol. 28, no 10, p. 999-1003.
- Newman, M. A., et S. M. Hammond. 2010. «Emerging paradigms of regulated microRNA processing». *Genes Dev*, vol. 24, no 11, p. 1086-1092.
- Nilsen, T. W. 2007. «Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells». *Trends Genet*, vol. 23, no 5, p. 243-249.
- Noguer-Dance, M., S. Abu-Amero, M. Al-Khtib, A. Lefevre, P. Coullin, G. E. Moore et J. Cavaille. 2010. «The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta». *Hum Mol Genet*, vol. 19, no 18, p. 3566-3582.
- Oda, M., K. Shiota et S. Tanaka. 2006. «Trophoblast stem cells». *Methods Enzymol*, vol. 419, p. 387-400.
- Oeztuerk-Winder, F., A. Guinot, A. Ochalek et J. J. Ventura. 2012. «Regulation of human lung alveolar multipotent cells by a novel p38alpha MAPK/miR-17-92 axis». *EMBO J*, vol. 31, no 16, p. 3431-3441.
- Oh, S. Y., Y. Ju et H. Park. 2009. «A highly effective and long-lasting inhibition of miRNAs with PNA-based antisense oligonucleotides». *Mol Cells*, vol. 28, no 4, p. 341-345.
- Okamura, K., W. J. Chung et E. C. Lai. 2008. «The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs». *Cell Cycle*, vol. 7, no 18, p. 2840-2845.
- Orendi, K., M. Gauster, G. Moser, H. Meiri et B. Huppertz. 2010. «The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins». *Reproduction*, vol. 140, no 5, p. 759-766.
- Paroo, Z., X. Ye, S. Chen et Q. Liu. 2009. «Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling». *Cell*, vol. 139, no 1, p. 112-122.
- Peter, M. E. 2010. «Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step». *Oncogene*, vol. 29, no 15, p. 2161-2164.

- Pheasant, M., et J. S. Mattick. 2007. «Raising the estimate of functional human sequences». *Genome Res*, vol. 17, no 9, p. 1245-1253.
- Pidoux, G., P. Gerbaud, M. Cocquebert, N. Segond, J. Badet, T. Fournier, J. Guibourdenche et D. Evain-Brion. 2012. «Review: Human trophoblast fusion and differentiation: lessons from trisomy 21 placenta». *Placenta*, vol. 33 Suppl, p. S81-86.
- Pidoux, G., P. Gerbaud, S. Gnidehou, M. Grynberg, G. Geneau, J. Guibourdenche, D. Carette, L. Cronier, D. Evain-Brion, A. Malassine et J. L. Frendo. 2010. «ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 298, no 6, p. C1517-1526.
- Pineles, B. L., R. Romero, D. Montenegro, A. L. Tarca, Y. M. Han, Y. M. Kim, S. Draghici, J. Espinoza, J. P. Kusanovic, P. Mittal, S. S. Hassan et C. J. Kim. 2007. «Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia». *Am J Obstet Gynecol*, vol. 196, no 3, p. 261 e261-266.
- Potgens, A. J., S. Drewlo, M. Kokozidou et P. Kaufmann. 2004. «Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action». *Hum Reprod Update*, vol. 10, no 6, p. 487-496.
- Potgens, A. J., U. Schmitz, P. Bose, A. Versmold, P. Kaufmann et H. G. Frank. 2002. «Mechanisms of syncytial fusion: a review». *Placenta*, vol. 23 Suppl A, p. S107-113.
- Pouliot, L. M., Y. C. Chen, J. Bai, R. Guha, S. E. Martin, M. M. Gottesman et M. D. Hall. 2012. «Cisplatin sensitivity mediated by WEE1 and CHK1 is mediated by miR-155 and the miR-15 family». *Cancer Res*.
- Prieto, D. M., et U. R. Markert. 2011. «MicroRNAs in pregnancy». *J Reprod Immunol*.
- Prudhomme, S., G. Oriol et F. Mallet. 2004. «A retroviral promoter and a cellular enhancer define a bipartite element which controls env ERVWE1 placental expression». *J Virol*, vol. 78, no 22, p. 12157-12168.
- Ragan, C., M. Zuker et M. A. Ragan. 2011. «Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations». *PLoS Comput Biol*, vol. 7, no 2, p. e1001090.
- Ray, J., A. Jurisicova et I. Caniggia. 2009. «IFPA Trophoblast Research Award Lecture: the dynamic role of Bcl-2 family members in trophoblast cell fate». *Placenta*, vol. 30 Suppl A, p. S96-100.
- Reichel, M., J. Li et A. A. Millar. 2011. «Silencing the silencer: strategies to inhibit microRNA activity». *Biotechnol Lett*, vol. 33, no 7, p. 1285-1292.
- Ripoli, A., G. Rainaldi, M. Rizzo, A. Mercatanti et L. Pitto. 2010. «The Fuzzy Logic of MicroRNA Regulation: A Key to Control Cell Complexity». *Curr Genomics*, vol. 11, no 5, p. 350-353.
- Rote, N. S. 2005. «Intercellular fusion of BeWo». *Placenta*, vol. 26, no 8-9, p. 686; author reply 687.

- Rote, N. S., B. R. Wei, C. Xu et L. Luo. 2010. «Caspase 8 and human villous cytotrophoblast differentiation». *Placenta*, vol. 31, no 2, p. 89-96.
- Rote, N. S., S. Chakrabarti et B. P. Stetzer. 2004. «The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development». *Placenta*, vol. 25, no 8-9, p. 673-683.
- Ruby, J. G., C. H. Jan et D. P. Bartel. 2007. «Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing». *Nature*, vol. 448, no 7149, p. 83-86.
- Ruebner, M., M. Langbein, P. L. Strissel, C. Henke, D. Schmidt, T. W. Goecke, F. Faschingbauer, R. L. Schild, M. W. Beckmann et R. Strick. 2012. «Regulation of the human endogenous retroviral Syncytin-1 and cell-cell fusion by the nuclear hormone receptors PPARgamma/RXRalpha in placentogenesis». *J Cell Biochem*, vol. 113, no 7, p. 2383-2396.
- Ruebner, M., P. L. Strissel, M. Langbein, F. Fahlbusch, D. L. Wachter, F. Faschingbauer, M. W. Beckmann et R. Strick. 2010. «Impaired cell fusion and differentiation in placentae from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes». *J Mol Med (Berl)*, vol. 88, no 11, p. 1143-1156.
- Schnall-Levin, M., O. S. Rissland, W. Johnston, N. Perrimon, D. P. Bartel et B. Berger. 2011. «Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs». *Genome Res*.
- Schubert, S. W., A. Abendroth, K. Kilian, T. Vogler, B. Mayr, I. Knerr et S. Hashemolhosseini. 2008. «bZIP-Type transcription factors CREB and OASIS bind and stimulate the promoter of the mammalian transcription factor GCMA/Gcm1 in trophoblast cells». *Nucleic Acids Res*, vol. 36, no 11, p. 3834-3846.
- Seifarth, W., O. Frank, U. Zeilfelder, B. Spiess, A. D. Greenwood, R. Hehlmann et C. Leib-Mosch. 2005. «Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray». *J Virol*, vol. 79, no 1, p. 341-352.
- Seitz, H. 2009. «Redefining microRNA targets». *Curr Biol*, vol. 19, no 10, p. 870-873.
- Shibukawa, Y., N. Yamazaki, K. Kumasawa, E. Daimon, M. Tajiri, Y. Okada, M. Ikawa et Y. Wada. 2010. «Calponin 3 regulates actin cytoskeleton rearrangement in trophoblastic cell fusion». *Mol Biol Cell*, vol. 21, no 22, p. 3973-3984.
- Sibley, C. R., Y. Seow, S. Saayman, K. K. Dijkstra, S. El Andaloussi, M. S. Weinberg et M. J. Wood. 2012. «The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin». *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no 1, p. 438-448.
- Simmons, D. G., et J. C. Cross. 2005. «Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta». *Dev Biol*, vol. 284, no 1, p. 12-24.
- Skalsky, R. L., et B. R. Cullen. 2010. «Viruses, microRNAs, and host interactions». *Annu Rev Microbiol*, vol. 64, p. 123-141.

- Soe, K., T. L. Andersen, A. S. Hobolt-Pedersen, B. Bjerregaard, L. I. Larsson et J. M. Delaisse. 2011. «Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion». *Bone*, vol. 48, no 4, p. 837-846.
- Spruce, T., B. Pernaute, A. Di-Gregorio, B. S. Cobb, M. Merckenschlager, M. Manzanares et T. A. Rodriguez. 2010. «An early developmental role for miRNAs in the maintenance of extraembryonic stem cells in the mouse embryo». *Dev Cell*, vol. 19, no 2, p. 207-219.
- Strauss, J. F., 3rd, S. Kido, R. Sayegh, N. Sakuragi et M. E. Gafvels. 1992. «The cAMP signalling system and human trophoblast function». *Placenta*, vol. 13, no 5, p. 389-403.
- Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J. S. Pober et W. C. Sessa. 2007. «Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells». *Circ Res*, vol. 100, no 8, p. 1164-1173.
- Tang, G., X. Tang, V. Mendu, X. Jia, Q. J. Chen et L. He. 2008. «The art of microRNA: various strategies leading to gene silencing via an ancient pathway». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1779, no 11, p. 655-662.
- Thomas, M., J. Lieberman et A. Lal. 2010. «Desperately seeking microRNA targets». *Nat Struct Mol Biol*, vol. 17, no 10, p. 1169-1174.
- Toufaily, C., A. Vargas, M. Lemire, J. Lafond, E. Rassart et B. Barbeau. 2013. «MFSD2a, the Syncytin-2 receptor, is important for trophoblast fusion». *Placenta*, vol. 34, no 1, p. 85-88.
- Trejbalo, K., J. Blazkova, M. Matouskova, D. Kucerova, L. Pecnova, Z. Vernerova, J. Heracek, I. Hirsch et J. Hejnar. 2011. «Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin». *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no 20, p. 8728-8739.
- Trompeter, H. I., H. Abbad, K. M. Iwaniuk, M. Hafner, N. Renwick, T. Tuschl, J. Schira, H. W. Muller et P. Wernet. 2011. «MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC». *PLoS One*, vol. 6, no 1, p. e16138.
- Tsai, K. W., H. W. Kao, H. C. Chen, S. J. Chen et W. C. Lin. 2009. «Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells». *Epigenetics*, vol. 4, no 8, p. 587-592.
- Ulitsky, I., L. C. Laurent et R. Shamir. 2010. «Towards computational prediction of microRNA function and activity». *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no 15, p. e160.
- Vaillancourt, C., D. Lanoix, F. Le Bellego, G. Daoud et J. Lafond. 2009. «Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation». *Mini Rev Med Chem*, vol. 9, no 8, p. 962-973.
- Vargas, A., J. Moreau, F. Le Bellego, J. Lafond et B. Barbeau. 2008. «Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor». *Placenta*, vol. 29, no 2, p. 170-174.

- Vargas, A., J. Moreau, S. Landry, F. LeBellego, C. Toufaily, E. Rassart, J. Lafond et B. Barbeau. 2009. «Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells». *J Mol Biol*, vol. 392, no 2, p. 301-318.
- Vargas, A., M. Thiery, J. Lafond et B. Barbeau. 2012. «Transcriptional and functional studies of Human Endogenous Retrovirus envelope EnvP(b) and EnvV genes in human trophoblasts». *Virology*, vol. 425, no 1, p. 1-10.
- Wadzinski, B. E., W. H. Wheat, S. Jaspers, L. F. Peruski, Jr., R. L. Lickteig, G. L. Johnson et D. J. Klemm. 1993. «Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation». *Mol Cell Biol*, vol. 13, no 5, p. 2822-2834.
- Wang, K., S. Zhang, J. Weber, D. Baxter et D. J. Galas. 2010. «Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells». *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no 20, p. 7248-7259.
- Wang, W., L. Feng, H. Zhang, S. Hachy, S. Satohisa, L. C. Laurent, M. Parast, J. Zheng et D. B. Chen. 2012. «Preeclampsia Up-Regulates Angiogenesis-Associated MicroRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) That Target Ephrin-B2 and EPHB4 in Human Placenta». *J Clin Endocrinol Metab*.
- Wang, Y., H. M. Stricker, D. Gou et L. Liu. 2007. «MicroRNA: past and present». *Front Biosci*, vol. 12, p. 2316-2329.
- Warning, J. C., S. A. McCracken et J. M. Morris. 2011. «A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system». *Reproduction*, vol. 141, no 6, p. 715-724.
- Watson, E. D., et J. C. Cross. 2005. «Development of structures and transport functions in the mouse placenta». *Physiology (Bethesda)*, vol. 20, p. 180-193.
- Wice, B., D. Menton, H. Geuze et A. L. Schwartz. 1990. «Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation *in vitro*». *Exp Cell Res*, vol. 186, no 2, p. 306-316.
- Wu, N., E. Sulpice, P. Obeid, S. Benzina, F. Kermarrec, S. Combe et X. Gidrol. 2012. «The miR-17 family links p63 protein to MAPK signaling to promote the onset of human keratinocyte differentiation». *PLoS One*, vol. 7, no 9, p. e45761.
- Wu, S., S. Huang, J. Ding, Y. Zhao, L. Liang, T. Liu, R. Zhan et X. He. 2010. «Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region». *Oncogene*, vol. 29, no 15, p. 2302-2308.
- Xia, L., D. Zhang, R. Du, Y. Pan, L. Zhao, S. Sun, L. Hong, J. Liu et D. Fan. 2008. «miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells». *Int J Cancer*, vol. 123, no 2, p. 372-379.
- Yan, H. L., G. Xue, Q. Mei, Y. Z. Wang, F. X. Ding, M. F. Liu, M. H. Lu, Y. Tang, H. Y. Yu et S. H. Sun. 2009. «Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis». *EMBO J*, vol. 28, no 18, p. 2719-2732.

- Yang, M., Z. M. Lei et V. Rao Ch. 2003. «The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium». *Endocrinology*, vol. 144, no 3, p. 1108-1120.
- Yoshie, M., K. Kaneyama, K. Kusama, C. Higuma, H. Nishi, K. Isaka et K. Tamura. 2010. «Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells». *Hum Reprod*, vol. 25, no 9, p. 2229-2238.
- Yu, C., K. Shen, M. Lin, P. Chen, C. Lin, G. D. Chang et H. Chen. 2002. «GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion». *J Biol Chem*, vol. 277, no 51, p. 50062-50068.
- Yu, Z., S. Han, P. Hu, C. Zhu, X. Wang, L. Qian et X. Guo. 2011. «Potential role of maternal serum microRNAs as a biomarker for fetal congenital heart defects». *Med Hypotheses*, vol. 76, no 3, p. 424-426.
- Zhang, X., G. Yan, Z. Diao, H. Sun et Y. Hu. 2012. «NUR77 inhibits the expression of TIMP2 and increases the migration and invasion of HTR-8/SVneo cells induced by CYR61». *Placenta*, vol. 33, no 7, p. 561-567.
- Zhang, Y., Z. Diao, L. Su, H. Sun, R. Li, H. Cui et Y. Hu. 2010. «MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61». *Am J Obstet Gynecol*, vol. 202, no 5, p. 466 e461-467.
- Zhu, Q. Y., Q. Liu, J. X. Chen, K. Lan et B. X. Ge. 2010. «MicroRNA-101 targets MAPK phosphatase-1 to regulate the activation of MAPKs in macrophages». *J Immunol*, vol. 185, no 12, p. 7435-7442.
- Zhu, X. M., T. Han, I. L. Sargent, G. W. Yin et Y. Q. Yao. 2009. «Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies». *Am J Obstet Gynecol*, vol. 200, no 6, p. 661 e661-667.